

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	マクロファージの発生と分化に関する実験的解析 (2)
Author(s)	高橋, 潔
Citation	マクロファージの起源、発生と分化 : メチニコフの食細胞、アショッフ・清野の細網内皮系とファン・ファースの単核性食細胞系の諸学説を踏まえて: 309-364
Issue date	2008
Type	Book
URL	http://hdl.handle.net/2298/10441
Right	

3) マクロファージ、マクロファージ前駆細胞や単球の遊走と移住: ケモカイン ないしケモカイン受容体欠損あるいは遺伝子導入マウスを用いての検討

ケモカイン(chemokine)は白血球の遊走因子で、遊走性サイトカイン(chemotactic cytokine)の語に由来し、主に塩基性、ヘパリン結合性を示す 8~12kD 程度の分泌蛋白である¹³⁷⁰。ヒトでは 40 種類以上のケモカインが報告され、蛋白の N 末端のアミノ酸配列から CXC と CC との二つのファミリーに区別される¹³⁷⁰。CXC ケモカインのうちで SDF-1、すなわち CXCL12 は CD34 陽性造血幹細胞の遊走を促し、他方 CC ケモカインについては単球の遊走を惹起する因子として MCP-1 から MCP-4、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、HCC-1、Lkn/HCC-2、LEC/HCC-4 などが知られ¹³⁷⁰、このうち MCP-1 の遊走活性が最も強力である。以下主だったケモカインやケモカイン受容体の遺伝子欠損マウスについて述べる。

a) SDF-1/CXCL12 受容体欠損マウスならびに SDF-1 遺伝子導入マウス

SDF-1(stromal cell-derived factor-1)は別名 PBSF(pre-B cell stimulatory factor)とも呼ばれ、CXCL12(CXC chemokine ligand 12)と統一した名称が与えられ、N 末端には C-P-C (Cys-Pro-Cys)の配列を示す良く保存されたモチーフを保有する¹³⁷⁰。成熟蛋白には残基の異なった SDF-1 α と SDF-1 β とがあり¹³⁷⁰、SDF-1 の受容体は CXCR4 (CXCL12 chemokine receptor: CD184)と命名され、アゴニスト(agonist)とアンタゴニスト(antagonist)が存在する¹⁴⁶⁴。図 78 に示したように、RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)法で成熟正常マウスのほぼ全身各所の諸臓器、組織に SDF-1 mRNA の発現が確認され、CD34 陽性造血幹細胞や骨髄系前駆細胞の組織への遊走や移住に関与する。胎生期では、SDF-1 は卵黄嚢、肝原基、骨髄、脾原基、各所のリンパ組織などへの造血幹細胞ないし造血前駆細胞の遊走、移住やホーミングを促し^{1200, 1201, 1465~1472}、全身各所の免疫細胞とともに神経細胞にも SDF-1 受容体、CXCR4 (CD184)が発現する^{1200, 1202, 1465}。SDF-1 欠損マウスならびに CXCR4 欠損マウスでは、卵黄嚢における原始造血の発生は正常で、肝造血においても骨髄前駆細胞の減少は見られないが、骨髄造血は欠損し、造血幹細胞ならびに造血前駆細胞は欠如する。この事実から SDF-1 や CXCR4 は決定造血における B 細胞造血ならびに骨髄造血に重要であって、SDF-1 は骨髄ではストローマ細胞から産生される。しかし、骨髄以外でも種々の臓器や組織でも、例えば、破骨細胞、アストロサイトなど局所の細胞でも産生され、末梢組織への造血幹細胞ないし造血前駆細胞の流入や移住を促している^{1370, 1467~1470}。

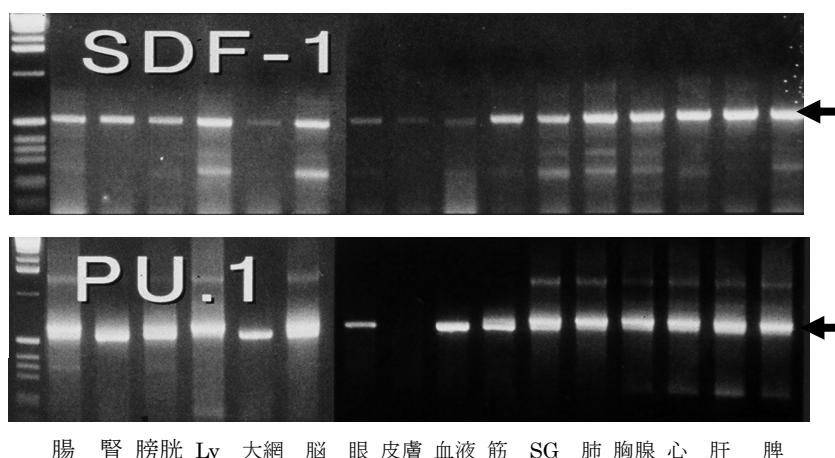
Broxmeyer ら(2003)はラウス肉腫ウイルス・プロモーターを組み込んだ SDF-1 遺伝子をマイクロインジェクトして SDF-1 遺伝子導入マウスを作製した^{1471, 1472}。SDF-1 遺伝子導入マウスの多くの組織や細胞は SDF-1 を過剰に産生し、造血幹細胞を含む骨髄前駆細胞のこれら組織への遊走、移住やホーミングを促す他に、培養実験では骨髄前駆細胞の生存を亢進させる作用を有することが明らかにされた^{1471, 1472}。すべての増殖因子を除去した状態

で培養しても SDF-1 遺伝子導入マウスの骨髄系前駆細胞は生存を亢進し、抗アポトーシス作用を保有している。SDF-1 遺伝子導入マウスの生体内では、骨髄や脾臓での骨髄造血の亢進が惹起される^{1473, 1474)}。この生存亢進作用は産生・分泌された低レベルの SDF-1/CXCL12 でも CXCR4 ならびに G α_i 蛋白を介しての骨髄前駆細胞へ取り込まれ、低レベルの GM-CSF、SCF、Flt-3 などの他のサイトカインと反応し、相乗効果によって発揮される^{1473, 1474)}。このように、SDF-1 は造血幹細胞ならびに造血前駆細胞の遊走、移住、生存、抗アポトーシス作用を惹起し、全身各所の組織で産生される SDF-1 は末梢局所への造血幹細胞ないし造血前駆細胞の遊走、移住、生存を促し、例えば、末梢血中の造血前駆細胞が CXCR4 を介して骨組織に遊走、移住し、破骨細胞への分化、増殖、生存に関与する¹⁴⁷⁴⁾。ヒト臍帯血 CD34 陽性造血細胞は G-CSF と GM-CSF の投与によって SDF-1/CXCL12 に対する応答の低下をもたらす¹⁴⁶⁹⁾、rhM-CSF の投与はマウスの血管損傷初期における血管内膜への骨髄由来の前駆細胞の SDF-1/CXCR4 機序を介しての移住や生存を亢進させる¹⁴⁷⁶⁾。

SDF-1 の遊走、移住、ホーミング、生存維持、抗アポトーシス作用などは ES 細胞にも発現し、培養上 ES 細胞は低レベルの SDF-1 を産生、分泌し、低レベルの CXCR4 を発現し、SDF-1/CXCR4 の発現は ES 細胞の分化とともに増加する¹⁴⁷⁵⁾。血清を除去し、LIF (leukemia inhibitory factor) の存在下での培養では、ES 細胞から産生、分泌された SDF-1 は自己の生存を亢進し、アポトーシスを抑制し、これに SDF-1 を加えると、生存の延長とアポトーシスの抑制をさらに助長する¹⁴⁷⁵⁾。ES 細胞で産生、分泌された SDF-1、あるいは投与された SDF-1 は胚子様小体 (embryoid bodies) の形成を促し、原始的ないし決定的赤芽球系、顆粒球・マクロファージ系、ならびに多潜能性造血前駆細胞が産生される¹⁴⁷⁵⁾。

嘗て Tavasoli & Yoffey (1983)³⁹⁸⁾ が骨髄で産生された造血幹細胞ないし造血前駆細胞が末梢血中に放出され、末梢組織に動員され、組織に移住し、マクロファージに分化する過程を主張したが、Wright ら(2001)によると、遺伝的に標識されたマウスのパラビオーシス実験で、相互の動物は共通した循環系を形成し、それぞれのマウスに由来する造血幹細胞ならびに前駆細胞は生理的にも末梢血から相手の動物の組織に移住することが実証され、手術的にマウスを分離してもドナー由来の造血幹細胞は少なくとも 22 週間の長期に亘り維持され、末梢血から速やかに骨髄や脾臓などの組織に移住することが明らかにされている¹⁴⁷⁶⁾。さらに、造血組織以外の骨格筋、心臓、脳、脾臓、肝臓、腎臓、肺臓、小腸などの FACS 解析で、これらの組織の副次的細胞集団内に造血前駆細胞が相当数存在し、CD45(LCA)を表出し、末梢血細胞に比較してより顕著な造血コロニー形成能を示した¹⁴⁷⁷⁾。これらの諸事実は造血幹細胞ないし造血前駆細胞の組織内に移住し、この過程では SDF-1/CXCR4 は重要な役割を演ずる^{1473, 1474)}。SDF-1 の他に、SCF、Flt-3 リガンド¹⁴⁷⁸⁾、PU.1¹³⁶⁷⁾、IL-3¹⁴⁷⁹⁾、GM-CSF¹⁴⁷⁹⁾、M-CSF、G-CSF やこれらの因子の相乗効果によって骨髄から末梢血へ造血幹細胞が動員され、このことはヒトやマウスを中心に自家あるいは同種の骨髄移植、末梢血造血幹細胞の注入や SDF-1 遺伝子導入マウスによって明らかにされている^{1473,}

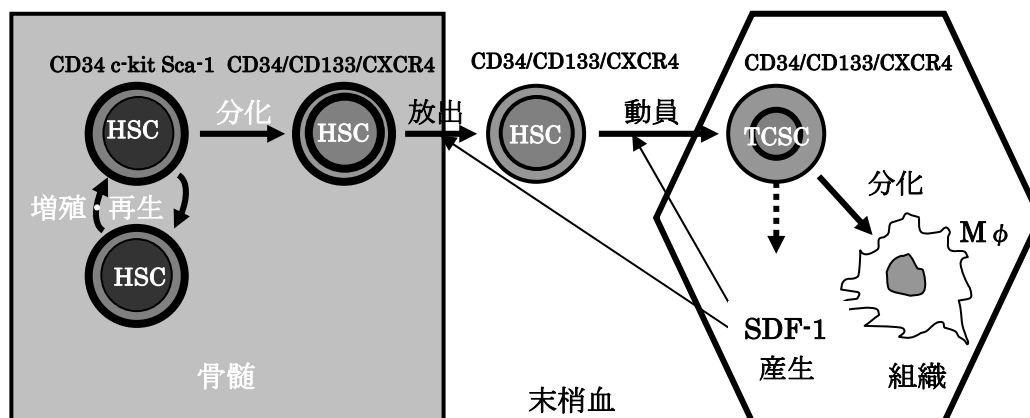
図 78 成熟マウスの諸臓器や組織における SDF-1 と PU.1 mRNA の発現 (RT-PCR 法)。(Ly:リンパ節、SG:唾液腺)。



1474, 1480~1482)。Fruehauf & Seggewiss (2003)の総説によると、無刺激定常状態での骨髄内では CD34 陽性細胞が約 1.1%、末梢血中では 0.06%であるが、SCF の投与では 20 倍、GM-CSF では 45 倍、G-CSF では 100 倍に末梢血中の造血幹細胞が増加する¹⁴⁸⁰。骨髄内の CD34 陽性細胞と末梢血中に動員された CD34 陽性細胞とでは機能的に著しく異なり、前者の細胞周期が速いのに対して、後者は G_0 期で細胞周期が停止し、末梢性組織内に移住した造血幹細胞の細胞周期も長期間静止する¹⁴⁸³。骨髄内の造血幹細胞と末梢血中を循環している造血幹細胞を比較すると、前者は細胞回転関連遺伝子や DNA 合成に必須の遺伝子の発現が高く、後者では caspase 3, 4, 8 を含むアポトーシス関連遺伝子の発現が高く、抗アポトーシス細胞質アンチプロテイナーゼの発現が低下し、骨髄から末梢血中に放出、動員された造血幹細胞の無秩序な増殖を惹起する機構が作働している^{1480, 1484}。

骨髄内の造血幹細胞はインテグリン、セレクトリン、免疫グロブリン・スーパーファミリー、CD44 ファミリーを含む広範な細胞接着分子を発現し、他方骨髄内微少環境を構成しているストローマ細胞は接着分子の多くのリガンドを発現し、種々の基質成分と接着している^{1479, 1482, 1485}。無刺激定常状態の骨髄内造血幹細胞に比べて、末梢血中に動員された造血幹細胞は c-kit(CD117)、CD18/CD11a(インテグリン β_2 鎖)、CD49d(インテグリン α_4 鎖、VLA-4)、CD62L(L セレクトリン)、CXCR4 などの発現の著しい低下を示し、骨髄から末梢血中への造血幹細胞の動員を惹起する。末梢血中で白血球を血管内皮との接触を仲介する CD49d とそのリガンド、フィブロネクチン、CD49e(VLA-5)とその受容体、VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1)、CD62L は末梢血中の造血幹細胞にも発現し、末梢血中から組織内への移住に関与する^{1480, 1482, 1485}。VLA-4 と VCAM-1 とは造血幹細胞の骨髄内における停留や維持に関与し、VLA-4 と VCAM-1 とに対する抗体をマウスに投与すると、造血幹細胞の骨髄から末梢血中への動員を惹起する¹⁴⁸⁶。骨髄内で造血幹細胞における c-kit の発現が低下すると、造血幹細胞の末梢血中への放出が亢進し、造血幹細胞の骨髄内での産生と c-kit 発現とは逆相関を示す¹⁴⁸⁷。メタロプロテイナーゼ-9 (MMP-9)の活性化は c-kit

図 79 骨髓内での造血幹細胞の発生、分化と末梢血への放出、組織内移住ならびに組織マクロファージへの分化、成熟過程における SDF-1 の作用



HSC: hematopoietic stem cells、TCSC: tissue-committed stem cells、Mφ: マクロファージ

リガンドの放出を促し、造血幹細胞での c-kit の発現低下を起し、造血幹細胞の骨髓から末梢血中への産生、放出、動員を促進させる¹⁴⁸⁷⁾。骨髓内造血幹細胞は末梢血中の CD34 陽性細胞よりも CXCR4 の発現が高く¹⁴⁸⁸⁾、造血幹細胞にける CXCR4 の発現亢進と骨髓ストローマ細胞での SDF-1 の産生低下は骨髓から末梢血中への造血幹細胞の放出や動員を惹起する^{1487, 1489)}。逆に、末梢血から組織への移住には、局所組織で産生される SDF-1 が重要な役割を演じ、幹細胞因子(SCF)や IL-6 などの共同作用で末梢血中の造血幹細胞の増殖や造血前駆細胞の生存を促し¹⁴⁹⁰⁾、血中に CXCR4 の増加は造血幹細胞の末梢血中への動員に関与する¹⁴⁹¹⁾。造血幹細胞における CXCR4 の発現低下は組織への移住を起す¹⁴⁹²⁾。CXCR4 の作用発現には多様な物質やアンタゴニストが影響し、多様なシグナル伝達機構が存在する¹⁴⁹³⁾。

骨髓内には種々の組織コミット幹細胞(tissue-committed stem cells)に分化する CD34 陽性造血幹細胞の“潜伏場所”があり、CXCR4 を発現し、SDF-1 濃度勾配に応じて骨髓から末梢血へと動員され、臓器、組織に移住する¹⁴⁹⁴⁾。組織コミット幹細胞は、CXCR4 に加えて、造血幹細胞マーカーCD133 を表出する¹⁴⁹⁵⁾。ヒト末梢血から分離、増幅した CD133/CXCR4 陽性造血幹細胞に Flt-3/Flk2 リガンドと IL-6 を添加し、3～5 週間培養すると、CD45 陽性の付着細胞に分化し、さらに神経前駆細胞、肝細胞、骨格筋細胞などの組織細胞へと分化する¹⁴⁹⁶⁾。ヒト角膜では、正常時のストローマ細胞には少数ながら CD133 (5.3%)、CD34(3.6%)陽性の造血幹細胞が検出され、同時に CD45、CD14 のマクロファージ・マーカーを発現する¹⁴⁹⁷⁾。病的角膜では CD133/CD34 陽性造血幹細胞が 26.8%まで増加し、同時に CD14 を発現し、CD45 の発現は消失し、マクロファージに分化する¹⁴⁹⁷⁾。クローン形成検索では、正常角膜ストローマ細胞に検出される CD133/CD34 陽性造血幹細胞はマクロファージ・コロニーを形成し、ルミカン発現角膜細胞への分化が実証され、マク

ロファージと線維芽細胞とへの二方向分化を示す¹⁴⁹⁷⁾。以上の諸事実から、多分化能性骨髄幹細胞に起源する CD133/CXCR4 陽性造血幹細胞が骨髄から末梢血内に動員され、全身各所の臓器組織に移住し、組織コミット幹細胞へと分化し、種々の細胞へと分化し、同時に組織マクロファージへと分化、成熟する過程を辿ることが出来る（「マクロファージの分化転換と細胞融合」の項(p.400)参照）。

放射線照射による骨髄除去マウスに単一骨髄造血幹細胞を移植すると、骨髄幹細胞は多潜能と自己再生能を保持し、その 3 分の 1 が 9 週後も血球を産生し続け、骨髄系ならびにリンパ系血液細胞に移住し、ホーミング(帰巢)するが、生体内でも長期間自己再生を行う造血幹細胞はその一亜型に過ぎず、再移住する細胞は寡少クローン(oligoclonal)である¹⁴⁹⁸⁾。全身放射線照射 NOS (nonobese diabetic)/SCID マウス、 β_2 免疫グロブリン欠損 NOD/SCIDB2m^{null} マウスなどの免疫不全マウスを用いた検討では、ヒト造血幹細胞ないし前駆細胞は末梢血中から骨髄、脾臓などの組織への移住が知られており^{1490, 1499)}、Tavasoli & Yoffey (1983)³⁹⁸⁾が主張した如く、無刺激定常状態でも造血幹細胞ないし造血前駆細胞は骨髄から末梢血へ放出され、血中を循環し、末梢組織内に移住する。この機構には造血幹細胞の動員に係わる種々の物質のいち正常時でも低レベルながら発現している物質が関与するものと思われる。無刺激定常状態では、顆粒球系細胞や単球系細胞の骨髄系細胞は赤芽球系細胞、栓芽球と同様に分化が終末細胞にまで分化、成熟しないと、骨髄から放出、動員されない。しかし、肥満細胞やリンパ系細胞は造血幹細胞ないし造血前駆細胞の段階で、骨髄から放出される。組織マクロファージもまた骨髄から放出され、末梢血を介して組織に移住した造血幹細胞から分化し、次に述べる単球由来の滲出マクロファージ(炎症性マクロファージ)の分化過程と組織内移住機構とは異なる。

b) CC ケモカインならびにその受容体欠損マウス、ならびに遺伝子導入マウス

表 20 は単球の遊走を促す CC ケモカインを整理したもので、現在まで 12 種類の因子が知られ、その多くは単球のみならず T 細胞やその他の白血球の遊走も惹起する^{1370, 1500)}。そのうち MCP-1 が最も強力な遊走反応を発揮する。以下これら CC ケモカインの欠損マウスの研究成績を中心に述べる。

(1) MCP-1/CCR2 欠損マウスならびに MCP-1 遺伝子導入マウス

MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1)は 1989 年米国 NIC 吉村禎造博士によって発見された CC ケモカインの原型である^{1501, 1502)}。筆者が 1981 年熊本大学医学部病理学第二講座を担当した頃、隣の病理学第一講座の林秀夫教授のもので吉村博士は白血球の遊走因子に関する研究に従事していた。筆者はわれわれの講座で 1990 年以降共同研究者竹屋らを中心に研究グループを立ち上げ、ヒト、ラット、マウスでの MCP-1 に関して吉村博士との共同研究を行い、MCP-1 モノクローナル抗体を作製し、病理学的検討を行った¹⁵⁰³⁾。

局所の組織に刺激が加わると、マクロファージ、単球、線維芽細胞、血管内皮細胞、平

表 20 単球の遊走を起す CC ケモカイン

物質名	統一名称	標的細胞	受容体
I 309	CCL1	単球、T 細胞	CCR1
MCP-1	CCL2	単球、樹状細胞、T 細胞、好塩基球	CCR2、CCR11
MIP-1 α	CCL3	単球、T 細胞	CCR5、CCR1、CCR3
MIP-1 β	CCL4	単球、T 細胞	CCR5
RANTES	CCL5	単球、T 細胞、好酸球、好塩基球	CCR1、CCR3
MCP-3	CCL7	単球、T 細胞、好酸球	CCR2、CCR1、CCR 3
MCP-2	CCL8	単球、T 細胞、好酸球	CCR2、CCR1、CCR3
MCP-4	CCL13	単球、T 細胞、好酸球	CCR2、CCR1、CCR3
HCC-1	CCL14	単球	CCR5、CCR1
Lkn-1/HCC-2	CCL15	単球、好中球、リンパ球	CCR1
LEC/HCC-4	CCL16	単球、好酸球	CCR1
MPIF-1	CCL23	単球、T 細胞	CCR1

滑筋細胞、上皮細胞など種々の細胞で MCP-1 が産生、放出され、単球、好酸球、好塩基球、樹状細胞、T リンパ球などの遊走を惹起し、組織への浸潤を誘導し、とりわけ単球を強力に引きつけ、種々の炎症性病態や腫瘍などに滲出マクロファージの浸潤を起す^{1503~1507}。

ラットから抽出、精製した MCP-1 を皮下注射すると、注射部位の血管、ことに毛細血管や細静脈の周囲には単球と TRPM-3(CD169)陽性の滲出マクロファージとの浸潤が起り、血管腔内にも単球に集族、貯留し、一部は TRPM-3 陽性を示し、滲出マクロファージへの分化を惹起する⁴⁶⁹。PO 電顕でも顆粒のみに PO 活性の局在が見られ、滲出マクロファージの超微形態を示す。しかしながら、マクロファージは組織マクロファージのマーカーである ED2(CD163)は陰性で、OP 電顕でも在住マクロファージの超微形態と PO 活性局在パターンとは異なる⁴⁶⁹。以上の事実から MCP-1 は局所組織で産生され、単球に発現する MCP-1 受容体 CCR2 を介して単球に作用し、組織局所への単球の浸潤を惹起し、滲出マクロファージへの分化に関与する。しかし、MCP-1 は組織マクロファージの遊走や移住には関与しない。しかし、局所組織での刺激によってまず既存の組織マクロファージが MCP-1 を産生し、単球の局所組織内への浸潤や移住を誘導する。

Maus ら(2001~2003、2005)は CCR2 欠損マウスや野生型マウスを用い、抗 CCR2 遮断モノクローナル抗体 MC21 を加えた研究^{1508~1512}で、肺臓に MCP-1 や LPS の単独あるいは両者併用の気管内投与によって末梢血単球の肺胞腔内への浸潤過程について脂質親和性蛍光色素 PKH26 や、さらに F4/80、CD11a、CD11b、CD14、CD18、CD49d、CD62L などのモノクローナル抗体を併用して蛍光抗体法での検討を行った。PKH26 は肺胞マクロファージに取り込まれ、蓄積し、強い蛍光を発するのに対して、血液単球は PKH26 によって

はラベルされないことから肺泡マクロファージと血液単球とは識別される^{1508~1512})。この検討で、LPS 刺激によって末梢血から肺腔内へ単球が侵入し、この過程は MCP-1 が密接に関連し、MCP-1 の気管内投与でも肺腔内への単球の浸潤が起る。しかし、CCR2 欠損マウスでは単球の浸潤は起らず、この浸潤過程は CCR2 発現に依存し、肺腔内に移住した単球では CD14 の発現が増強し、サイトカインの発現亢進を起し、エンドトキシンに対する反応亢進の引き金になる¹⁵⁰⁸)。CCR2 発現単球は血中から炎症状態の肺腔内に移住すると、局所の MCP-1 は消費され、局所組織での MCP-1 の発現レベルは低下する¹⁵⁰⁹)。致死的 X 線照射 CCR2 欠損マウスに野生型マウスの骨髄を移植し、肺泡マクロファージあるいは単球を投与し、これらの細胞の動態を検討した。その結果、LPS 誘発肺臓における好中球の浸潤は CCR2 に依存せず、CCR2 発現単球は好中球の浸潤を惹起し、単球は急性肺炎状態での強力な好中球浸潤を促進し、単球と好中球との急性炎症の初期における協調作用が明らかにされている^{1510, 1512})。

MCP-1 の産生は感染に際して MIP-1 α の産生に先行して惹起され、その誘導は IFN- α/β に依存し、肝臓では既存の F4/80 陽性 Kupffer 細胞が最初の IFN- α/β 反応細胞で、MCP-1 あるいは CCR2 欠損マウスでの検討では、MCP-1 の主要産生細胞であることが実証されている¹⁵¹¹)。さらに、MCP-1 欠損マウスや CCR2 欠損マウスでは、炎症性病変、感染症、肉芽腫、動脈硬化症あるいは動脈損傷などへの単球の侵潤は起らず、滲出マクロファージを欠如する^{1508~1513})。しかし、MCP-1/CCR2 欠損マウスでは、無刺激定常状態の各所組織では常在する組織マクロファージの数は野生型マウスとほぼ同じで、CCR2 欠損マウスのランゲルハンス細胞の数は正常で、樹状細胞の真皮内への移住も正常である¹⁴⁹¹)。しかし、CCR2 欠損マウスでの樹状細胞の局所リンパ節への移住は極度に障害され、脾臓でも樹状細胞の数は減少し、主として CD8 α 陽性樹状細胞が減少する¹⁵¹²)。従って、MCP-1 や CCR2 欠損マウスの検索結果から MCP-1 や CCR2 は刺激に際して単球の局所組織内への侵入に重要で、CCR2 は樹状細胞の移住にも必要であるが、無刺激定常状態では各所組織に在住する組織マクロファージやランゲルハンス細胞の発達には関与しない。さらに、CCR2 欠損マウスでは、単球のみならず骨髄ならびに脾臓での骨髄系造血前駆細胞にも異常が発現し、野生型マウスに比較して、骨髄の造血前駆細胞は著しい増殖亢進を惹起するが、脾臓の造血前駆細胞では明らかではない¹⁵¹⁴)。しかし、CCR2 欠損マウスでは骨髄系前駆細胞の増減はなく、増殖とアポトーシスとがともに亢進し、細胞回転も亢進し、骨髄系造血前駆細胞の生存が維持される¹⁵¹³)。このように、CCR2 によって伝達されるシグナルは骨髄系造血前駆細胞の増殖とアポトーシスを調節し、同時に生存を維持する役割を果たしている。

MCP-1 遺伝子導入マウスでは、全身局所で組織内に MCP-1 の過剰産生が起り、末梢血中に MCP-1 が増量し、単球増多症が惹起される。臓器、組織によっては炎症状態が局所的に発現し、例えば、肥満における脂肪組織では、極めて軽微ながら慢性炎症状態にあると言われ、MCP-1 遺伝子導入マウスでは、脂肪組織に MCP-1 の産生が亢進し、MCP-1 の血中濃度が増加し、血中で増加した単球は MCP-1 の作用で脂肪組織内へ浸潤し、滲出マクロ

ファージへと分化し、マクロファージは増加する¹⁵¹⁶⁾。MCP-1 遺伝子導入マウスでは、胸腺や中枢神経組織に MCP-1 の過剰発現が惹起され、胸腺と中枢神経系組織に単球が浸潤し、滲出マクロファージが増加する¹⁵¹⁷⁾。しかし、中枢神経系の実質組織内への単球/マクロファージの浸潤は極めて少なく、概ね血管周囲に局限し¹⁵¹⁸⁾、この単球/マクロファージの浸潤過程は筆者らが行ったラットでの MCP-1 の皮下注射実験で観察された現象と同様である⁴⁶⁹⁾。このように、MCP-1 遺伝子導入マウスでの単球/マクロファージの浸潤はある特定の臓器、組織に局限して惹起され、主に血管周囲への分布を示すが、すべての臓器、組織に移住し、組織マクロファージの増加を惹起することはない。

単球遊走因子には MCP-1(CCL2)以外に MIP-1 α (CCL3)、MIP-1 β (CCL4)、RANTES(CCL5)、MCP-2(CCL8)、MCP-3(CCL7)、MCP-4(CCL13)などの蛋白が知られている(表 20 参照)。Reckless ら (1999)はアポリポ蛋白 (apolipoprotein (a):apo(a)) 遺伝子導入マウスを高コレステロール(脂肪)食で飼育し、動脈粥状硬化病変を発症させ、MCP-1、MIP-1 α 、TNF- α などの種々の単球遊走因子を比較検討した¹⁵¹⁸⁾。その結果、apo (a)遺伝子導入マウスの高脂肪食飼育で発症する動脈硬化病変内における単球/マクロファージの浸潤と MCP-1 の発現とは相関関係を示し、MIP-1 α や TNF- α などとは関連を示さず、種々の単球遊走因子の中で MCP-1 が最も重要であることが指摘されている¹⁵¹⁹⁾。IL-13 は Th2 細胞型サイトカインの一種で、IL-4 と共通の生物活性を有し、MCP-1 のみならず MCP-2、MCP-3、MCP-5、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-2、MIP-3 α などの刺激因子でもある。Zhu ら(2002)は IL-13 遺伝子導入マウスと CCR2 欠損マウスを交配させて IL-13 遺伝子導入 CCR2 欠損マウスを作製し、肺臓を刺激して検討し、IL-13 は MCP-1 のみならずその他の単球遊走因子であるが、IL-13 のシグナル伝達には CCR2 が重要であることを明らかにした¹⁵¹⁹⁾。

上述した諸事実から MCP-1 や CCR2 は単球の局所組織への遊走や移住に重要な役割を演じ、組織に侵入した単球は滲出マクロファージに分化することが実証されている。しかし、局所組織には組織マクロファージの浸潤は起らない。CCR2 欠損マウスでも、無刺激定常状態では全身各所に常在する組織マクロファージの数の減少は見られない。CCR2 欠損マウスの局所に炎症、とりわけ肝肉芽腫性病変が惹起された場合でも炎症巣内には CCR2 陰性マクロファージが浸潤し、これらのマクロファージの組織内移住に関しては MCP-1/CCR2 仲介機構以外によるものと思われる。上述した如く、MCP-1 遺伝子導入マウスで、全身各所の臓器、組織で過剰産生された MCP-1 は血中 MCP-1 の増量と単球増多症を惹起するにも拘わらず組織への単球の侵入は概ね血管周囲に限られ、全身組織にマクロファージが増加し、組織マクロファージの分布様式を取ることはない。この事実は筆者らが行ったマウスでの M-CSF 連日投与あるいは CSF 産生腫瘍株細胞の移植実験での実証された単球増多と組織マクロファージの動態に関する現象^{475~477)}と符合する。

(2) CCR5 欠損マウス

表 20 で示したように、培養実験の検討から、CCR5(CD195)は MIP-1 α 、MIP-1 β 、

RANTES と結合し、反応し、単球/マクロファージや T 細胞、好酸球、好塩基球に発現することが明らかにされている。しかし、MIP-1 α 、RANTES とはマウスで CCR1 や CCR3 とともに結合することから、CCR5 として特異的なものは MIP-1 β 受容体のみである。生体内では、CCR5 は II 型コラーゲン誘発関節炎、T 細胞介在性自己免疫疾患、実験的自己免疫性脳脊髄炎、ウイルス性炎症などの病因に関与し^{1520~1523}、CCR5 遺伝子に突然変異の見られる約 1% の白人は HIV-1 感染に抵抗性を示す^{1524, 1525}。CCR5 は HIV-1 主要コレセプターのマウス相同体で、単球/マクロファージに発現し、CCR5 欠損マウスでは、リステリア感染の排除効率が低下し、LPS 誘発内毒素血症に対して防御作用を営み、マクロファージの機能異常ないし部分的欠損を示す¹⁵²⁶。しかしながら、CCR5 欠損マウスでは、中枢神経系での大脳海馬域の軸索損傷時マクロファージの浸潤による障害はなく、RANTES/CCL5 の作用は必ずしも重要ではない¹⁵²⁷。このように、CCR5 欠損マウスの検討からは CCR5 はマクロファージの遊走、浸潤、移住には必須ではない。

c) CX₃CR 欠損ないし CX₃CR^{GFP} 遺伝子導入マウス

CX₃C ケモカインにはフラクタルカイン(fractalkine: Fkn; 別名 neurotactin)が知られ、フラクタルカイン(CX₃CL)は単球の遊走因子であると同時に NK 細胞や T 細胞をも遊走させる。この因子は脳、肺臓、心臓、大腸などに強く発現し、活性化血管内皮細胞、神経細胞、ランゲルハンス細胞や樹状細胞、活性化 B 細胞、腸管上皮細胞などで産生される。フラクタルカインには、分泌型と膜結合型とがあり、膜結合型フラクタルカインはフラクタルカイン受容体で、CX₃CR1 と命名されている。この受容体は接着分子としても作用し、単球、滲出マクロファージ、ミクログリア、NK 細胞、CD8 陽性 T 細胞などに発現する。このように、フラクタルカインはケモカインとしての作用の他に、接着分子として機能する。単球や滲出マクロファージに発現する CX₃CR(CD183)は CXC ケモカイン SDF-1 の受容体 CXCR4 や MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES などの CC ケモカインの受容体 CCR5 と同様に、HIV-1 のエンベロップ部分と結合し、この結合はリガンドであるフラクタルカインで阻害され、HIV-1 の標的細胞への侵入にコレセプターとして作用する。

こう言った CX₃CR1 のケモカインと接着因子としての働きを生体内で実証するため、Jung ら(2000)は緑色蛍光蛋白(green fluorescent protein: GFP)をコードするレポーター遺伝子を膜結合型フラクタルカイン受容体(CX₃CR)遺伝子で置換し、CX₃CR1^{+/GFP}あるいは CX₃CR1^{GFP/GFP} 欠損マウスを作製した¹⁵²⁸。CX₃CR1^{+/GFP} ノックイン・マウスでは、CX₃CR1 は単球、NK 細胞、樹状細胞やミクログリアに発現するが、CX₃CR1 欠損マウス(CX₃CR1^{GFP/GFP})の解析上これらの細胞には CX₃CR1 が欠如し、これらの知見から CX₃CR1 のみがフラクタルカイン受容体であることが判る。これに対して、CX₃CR1^{+/GFP} ノックイン・マウスでは、単球、樹状細胞やミクログリアとは異なり、Kupffer 細胞、腹腔マクロファージや脾マクロファージなどの組織マクロファージは CX₃CR1 を保有せず、GFP は陰性である。しかしながら、CX₃CR1^{GFP/GFP} マウスでは CX₃CR1 の欠如にも係わらずチオグリコレート惹

起腹膜炎において単球の血管外遊出、病原微生物抗原や接触感作物に対しての樹状細胞の遊走や分化、末梢神経損傷におけるミクログリアの反応が障害されず、フラクタルカイン受容体の機能に関する予測とは異なった事実が提示された¹⁵²⁸⁾。ミクログリアは本質的に CX₃CR1 を保有するが、フラクタルカインを発現しない¹⁵²⁹⁾。しかし、ミクログリアをフラクタルカインで処理し、培養すると、Fas リガンド仲介細胞死は阻止され、ミクログリアはフラクタルカイン・CX₃CR1 パラクライン機序を介して生存する¹⁵³⁰⁾。

末梢血中を循環している単球には CX₃CR1 が発現するが、無刺激定常状態の肺臓に常在する肺泡マクロファージには CX₃CR1 は発現せず、Kupffer 細胞、脾マクロファージ、腹腔マクロファージなど種々の臓器、組織での組織マクロファージでも同様に CX₃CR1 の発現は見られない。この事実に着目し、Srivastava ら (2005)は CX₃CR1^{+/GFP} ノックイン・マウスを用いて検討を行い、末梢血単球は緑色の蛍光を放ち、CX₃CR1 を発現するのに対して、肺泡マクロファージは CX₃CR1 を保有せず、GFP は陰性であることを明らかにした。こう言った特性を利用して検討すると、末梢血単球と肺泡マクロファージなどの組織マクロファージとは明確に識別される¹⁵³⁰⁾。CX₃CR1^{+/GFP} ノックイン・マウスの炎症状態下での肺臓では、末梢血から肺腔内に侵入した単球は滲出マクロファージに分化し、KC、MIP-2、IP-10 などの好中球遊走蛋白、ライソゾーム酵素カテプシン B、L、K、TNF- α 、CD14、TLR (toll-like receptor) 4 などの産生亢進を惹起する。しかし、これらの遺伝子発現は無刺激定常状態での GFP 陰性肺泡マクロファージには認められず、単球ならびに炎症性滲出マクロファージと肺泡マクロファージとでは遺伝子発現の面からも相違し、単球系マクロファージ群の肺腔内への移住は肺泡マクロファージの発生とは異なった遺伝子発現機序によって誘導される¹⁵³⁰⁾。

以上の知見から CX₃CR1^{+/GFP} ノックイン・マウスの組織内への単球の浸潤と滲出マクロファージへの分化とは刺激によって惹起され、単球/滲出マクロファージはともに CX₃CR1 を発現し、血液単球から肺腔内への滲出マクロファージへの分化過程が実証される。これに対して、肺泡マクロファージは CX₃CR1 の発現は見られず、同様に Kupffer 細胞、脾マクロファージ、腹腔マクロファージなどの組織マクロファージも CX₃CR1 は陰性で、肺腔内への単球/滲出マクロファージの浸潤に伴って発現する遺伝子は肺泡マクロファージに起る遺伝子発現とは明らかに相違する。従って、局所に浸潤した単球が滲出マクロファージに分化することは CX₃CR1 の発現のみならず遺伝子発現の面からも実証されるが、滲出マクロファージと組織マクロファージとでは CX₃CR1 や遺伝子発現には顕著な差異が見られる。

d) 小括：マクロファージ前駆細胞ならびにマクロファージ亜群のケモカインならびにケモカイン受容体からの検討

マクロファージは末梢性組織で分化、成熟する造血細胞の終末細胞であって、原始造血、決定造血を問わず造血幹細胞が起源し、生後造血は骨髓に定着し、終生マクロファージ前

駆細胞を含む種々の造血細胞を産生し、末梢血中に放出する。胎生早期に発生する原始造血では造血幹細胞から単球系細胞の分化段階を経由せずに原始/胎生マクロファージに分化し、末梢性組織に移住し、組織マクロファージに分化、成熟する。生後骨髓内で造血幹細胞から発達する単球系細胞の最終細胞は単球で、無刺激定常状態では単球に分化、成熟すると、骨髓から末梢血中に放出され、血中を循環する。末梢性組織に刺激が惹起されると、単球は末梢血中から組織内に浸潤し、滲出マクロファージに分化する。しかし、無刺激定常状態では、単球以前の未熟な分化段階にある単芽球や前単球は骨髓から放出、末梢血中には動員されない。しかし、単球系細胞以前の分化段階にある造血幹細胞や造血前駆細胞は骨髓から放出され、末梢血中を循環し、全身各所の組織に移住する。このような造血幹細胞や造血前駆細胞、あるいは単球の骨髓から末梢血中への放出、動員、末梢性組織への移住には種々のケモカインが作用する。

SDF-1 は骨髓ばかりではなく全身各所の組織で産生され、その作用によって末梢血中を循環している造血幹細胞や造血前駆細胞は組織内に遊走、移住、あるいは帰巢し、CXCR4 を介して SDF-1 を取り込み、これらの未熟造血細胞は生存する。しかし、SDF-1/CXCR4 欠損マウスでは、骨髓内への造血幹細胞の遊走、移住、生存が障害され、骨髓造血は欠如する。すなわち、SDF-1 の産生は欠如するため、決定造血に起源する造血幹細胞の骨髓内への遊走、移住や帰巢は起らず、骨髓造血は形成されない。しかし、SDF-1/CXCR4 欠損マウスでは、原始造血は障害されず、卵黄囊造血は発生し、これは肝造血に移行し、胎生造血の初期に発生する原始造血は SDF-1 の作用を受けない。原始造血の未熟造血細胞は決定造血の造血幹細胞とは異なり、SDF-1 の影響を受けず、卵黄囊造血の未熟造血細胞は SDF-1 の欠損にも拘わらず胎仔組織に遊走、移住、帰巢する。

骨髓内で造血幹細胞は CD34、CD133、c-kit を発現するが、c-kit の発現が低下し、CXCR4 を発現すると、骨髓から末梢血中に放出、動員され、末梢性組織に移住し、CD34/CD133/CXCR4 陽性の組織コミット幹細胞に分化する。さらに、末梢性組織では CD34/CD133/CXCR4 陽性細胞はマクロファージへと分化する。PU.1 欠損マウスでは、未熟造血細胞やマクロファージ前駆細胞は末梢組織への遊走、移住や生存やマクロファージへの分化が障害され、組織内にはマクロファージは欠如する。M-CSF の欠損を示す *op/op* マウスでは、単球系細胞の発達が障害され、単球由来のマクロファージやその類縁細胞は欠如する。しかし、*op/op* マウスでは、正常マウスに比べて、組織マクロファージの数は減少するが、未熟かつ円形小型の未熟な組織マクロファージは全身各所の組織に発達、分布し、M-CSF の欠損は造血前駆細胞の末梢組織への遊走や移住ならびに未熟マクロファージの組織マクロファージへの成熟や増殖を障害する。しかし、*op/op* マウスでは、SCF、c-kit、GM-CSF や IL-3 などの種々の造血因子は産生され、それらの作用で造血幹細胞ないし造血前駆細胞からマクロファージ前駆細胞、さらに未熟組織マクロファージへと分化、生存、維持される。

これら SDF-1、PU.1、GM-CSF、M-CSF などは無刺激定常状態でも全身各所の組織で

常時構成的に産生され、造血幹細胞や造血前駆細胞あるいはマクロファージ前駆細胞の組織への遊走、移住、帰巢に作用している。これに対して、MCP-1を始め単球を遊走する多くのCCケモカインは無刺激定常状態の局所組織では産生されず、炎症や感染症などによる刺激によって産生され、末梢血中から組織へと単球が遊走し、組織内に移住し、単球は滲出ないし炎症性マクロファージへと分化する。CCケモカインのうちでMCP-1は最も強力な遊走活性を発揮する。MCP-1欠損マウスでも無刺激正常状態では全身各所の組織に分布する組織マクロファージは正常同腹マウスと同様で、MCP-1の欠如にも拘わらず組織マクロファージの発達は障害されない。MCP-1の局所投与は単球ないし滲出マクロファージの局所組織への著しい浸潤を惹起するが、組織マクロファージの浸潤は起らない。MCP-遺伝子導入マウスではMCP-1の過剰産生、末梢血MCP-1の増量、末梢血中単球の持続的増加が惹起される。しかし、全身各所の組織における組織マクロファージの系統的増加は惹起されない。後述する如く、CCR2欠損マウスでのグルカン投与肝肉芽腫でも野生型マウスでの肝肉芽腫と比較して肉芽腫形成は遅延し、これはCCR2欠損単球がMCP-1と作用せず、単球の動員、遊走や移住が障害される。しかし、CCR2欠損マウスでもグルカン投与で肝肉芽腫の形成が惹起され、この種の肉芽腫は既存のKupffer細胞の増殖あるいは単球以外のマクロファージ前駆細胞に由来するマクロファージによって形成される(「肉芽腫形成におけるマクロファージの実験的解析」の項(p. 336)参照)。

フラクタルカインの膜結合型は接着因子として作用し、可溶性型は遊走作用を有し、膜結合型フラクトカインは受容体としてCX₃CR1と呼ばれる。この受容体は単球に発現するが、無刺激定常状態では肺泡マクロファージを始めその他の組織マクロファージでは発現しない。この特性を用いて作製したCX₃CR1^{+/GFP}ノックイン・マウスの検討では、肺胞腔内に浸潤した単球の滲出マクロファージへの分化過程はGFPや遺伝子の発現から明らかであるが、肺泡マクロファージはGFP陰性で、遺伝子発現も異なり、これらの事象は単球系マクロファージと組織マクロファージとは異なった細胞群であることを裏付けている。

以上要約したケモカインとその受容体の遺伝子改変マウスによる解析からMPS学説で主張された単球の組織内への遊走、移住、侵入は刺激によって惹起される状態に起る現象であって、MCP-1を主とするCCケモカインあるいはCX₃Cケモカイン、それらの遺伝子改変マウスの研究からは単球が末梢血から組織へと滲出し、局所で滲出マクロファージに分化するが、組織マクロファージへの分化と成熟は起らない。これに対して、SDF-1、PU.1、GM-CSF、M-CSFなどやそれら受容体の遺伝子改変マウスの検討から無刺激定常状態の全身各所の組織内に常在する組織マクロファージは単球系細胞以前の分化段階にあるマクロファージ前駆細胞から由来し、造血幹細胞ないし造血前駆細胞は無刺激定常状態の全身各所の組織で産生されるSDF-1やPU.1の作用で末梢血から組織内に遊走、移住し、GM-CSFやM-CSFのこれらの細胞に対する遊走と増殖作用に加えて、組織マクロファージへと分化、成熟する。

4) マクロファージ受容体の欠損ないし遺伝子導入マウスを用いてのマクロファージ亜群の検討

マクロファージには種々の雑多な受容体が発現するが、炎症性マクロファージと呼ばれる単球由来のマクロファージには CD14 の発現するのに対して、組織マクロファージは無刺激定常状態でスカベンジャー受容体が発現する。以下これらの受容体の欠損ないし遺伝子導入マウスを中心に解説し、これら遺伝子改変マウスでの生体内における主だったマクロファージの亜群における機能的差異を述べる。

a) CD14、TLR-4、TNF- α 、MyD88 あるいは LITAF 欠損マウスならびに CD14 遺伝子導入マウス

リポ多糖類(Lipopolysaccharide: LPS)はグラム陰性菌外膜の重要な構成成分で、単球/マクロファージ、顆粒球、リンパ球の受容体 CD14 によって認識され、この受容体はとりわけ単球系細胞の有力なマーカーである^{1531, 1532}。LPS と CD14 (LPS 受容体)との相互作用は可溶性 LPS 結合蛋白質(LPS-binding protein: LBP)によって促進され、Toll 様受容体(Toll-like receptor: TLR)-4 もまた単球/マクロファージに表出される^{1531, 1532}。CD14 は単球の細胞膜のグルコシル・ホスファチジルイノシトール(glycosyl-phosphatidylinositol: GPI)に固着する糖蛋白質で、この膜結合型 CD14 は LPS 受容体である。その他に、可溶性(soluble) CD14(sCD14)が血清中や尿中に検出され、単球で産生された CD14 が可溶化したものである¹⁵³¹。ヒト CD14 遺伝子導入マウスの単球、好中球、Thy-1 陽性リンパ球、B リンパ球は細胞表面上にヒト CD14 を強く発現し、内毒素性ショックに対しての感受性の亢進を示す如く、LPS に対しての過敏性は増強する¹⁵³²。このため、ヒト CD14 遺伝子導入マウスは内毒素性ショックを惹起し、約半数の動物は死亡する。CD14 は好中球によっても産生され、sCD14 として末梢血中に放出され、単球から産生、放出されたものと同様の性状を示す¹⁵³³。

ヒト CD14 遺伝子導入マウスとは逆に、ES 細胞に CD14 標的遺伝子を導入して作製された CD14 欠損マウスでは、グラム陰性生菌の感染や LPS によって惹起されるショックに対して極度の抵抗を示し、炎症反応は惹起されず、TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインは殆ど産生されない¹⁵³⁴。LPS/sCD14 経路を介しての CD14 陰性単球の活性化は TNF- α の放出のみならず IL-1 β の産生によっても惹起される¹⁵³²。リコンビナント可溶性(recombinant soluble)CD14(rsCD14)や LPS によって CD14 陰性マクロファージは IL-1 β を産生するが、rsCD14 が欠如すると、LPS 刺激によっても CD14 陰性マクロファージからは IL-1 β は産生されない¹⁵³³。これに対して、細胞膜上に膜結合型 CD14 を保有する単球由来のマクロファージは LPS 刺激で活性化され、低濃度の LPS 刺激でも IL-1 β を産生する。しかしながら、投与した高濃度の LPS や強い細菌感染では、CD14 受容体を介さない機序でも炎症反応が惹起され、この機序には CD14 陰性の組織マクロファージによっても遂行され、組織マクロファージの活性化による貪食能の亢進、あるいはサイトカインの産生低

下によって菌血症は劇的に減退する¹⁵³³⁾。このように、CD14 欠損マウスの研究成績から単球ならびに単球由来の CD14 陽性マクロファージは LPS/sCD14 径路を介して種々の炎症性サイトカインを産生し、炎症反応を惹起する。しかしながら、高コレステロール食で飼育した CD14/アポ E 重複欠損マウスと同一条件で飼育したアポ E 欠損マウスとを比較すると、粥状動脈硬化症の初期病変には差異は顕著ではなく、CD14 の欠如は動脈硬化初期病変の発生には影響しない¹⁵³⁴⁾。

LPS/内毒素(endotoxin)や炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1、IL-6)は急性期蛋白(acute phase protein: APP)の強力な誘導物質で、単球の活性化によって発現する CD14 は LPS による APP 発現の誘導を仲介する。CD14 欠損マウスは野生型対照マウスに比較して、低濃度の LPS の投与による血清アミロイド A、LBP、フィブリノーゲン、セルロプラスミンなど急性期蛋白の発現誘導には差異は見られない¹⁵³⁵⁾。これに対して、C3H/HeJ マウスは *Lps* 遺伝子に突然変異を保有し、これらの蛋白質は発現しない。このように、CD14 欠損マウスと C3H/HeJ マウスとにおいて LPS によって誘導される APP の発現は CD14 非依存性の径路で惹起され、*Lps* 遺伝子が必要であって、TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインには依存しない¹⁵³⁶⁾。C3H/HeJ マウスと C57BL/10ScCr マウスとはともに *Lps* 遺伝子の突然変異上ホモ接合体(*Lps^{d/d}*)マウスで、C3H/HeJ マウスには *Tlr4* 遺伝子の点突然変異(コドン 712 のプロリンのヒスチジンによる置換)があり、C57BL/10ScCr マウスでは *Tlr4* 遺伝子が欠如しており、両種の変異マウスはともに LPS 刺激に対しての反応性の低下、内毒素ショックに対しての耐性を保有し、そのため致死効果に対して自然的に抵抗性を示す¹⁵³⁷⁾。

Poltorak ら(1998)は *Tlr4* 遺伝子が *Lps* 遺伝子と同一領域に局在し、C3H/HeJ マウスと C57BL/10ScCr マウスとでは *Tlr4* 遺伝子の突然変異によって LPS のシグナル伝達に欠損を起こすことを明らかにした¹⁵³⁸⁾。Hoshino ら(1999)は ES 細胞での相同遺伝子組み換えによって TLR-4 欠損状態を作製し、ターゲッティング・ベクターによって置換して TLR-4 欠損 ES 細胞を作製し、それから TLR-4 欠損マウスを造り出した¹⁵³⁹⁾。TLR-4 欠損マウスの胎仔は子宮内で正常に発育し、出産や生後の発育も正常で、生後 10 日までは異常は認められない。しかし、TLR-4 欠損マウスや C3H/HeJ マウスのマクロファージは LPS 刺激に対しての TNF- α の産生を欠如し¹⁵⁴⁰⁾、これらの事実から TLR-4 は *Lps* 遺伝子産物と見做される。

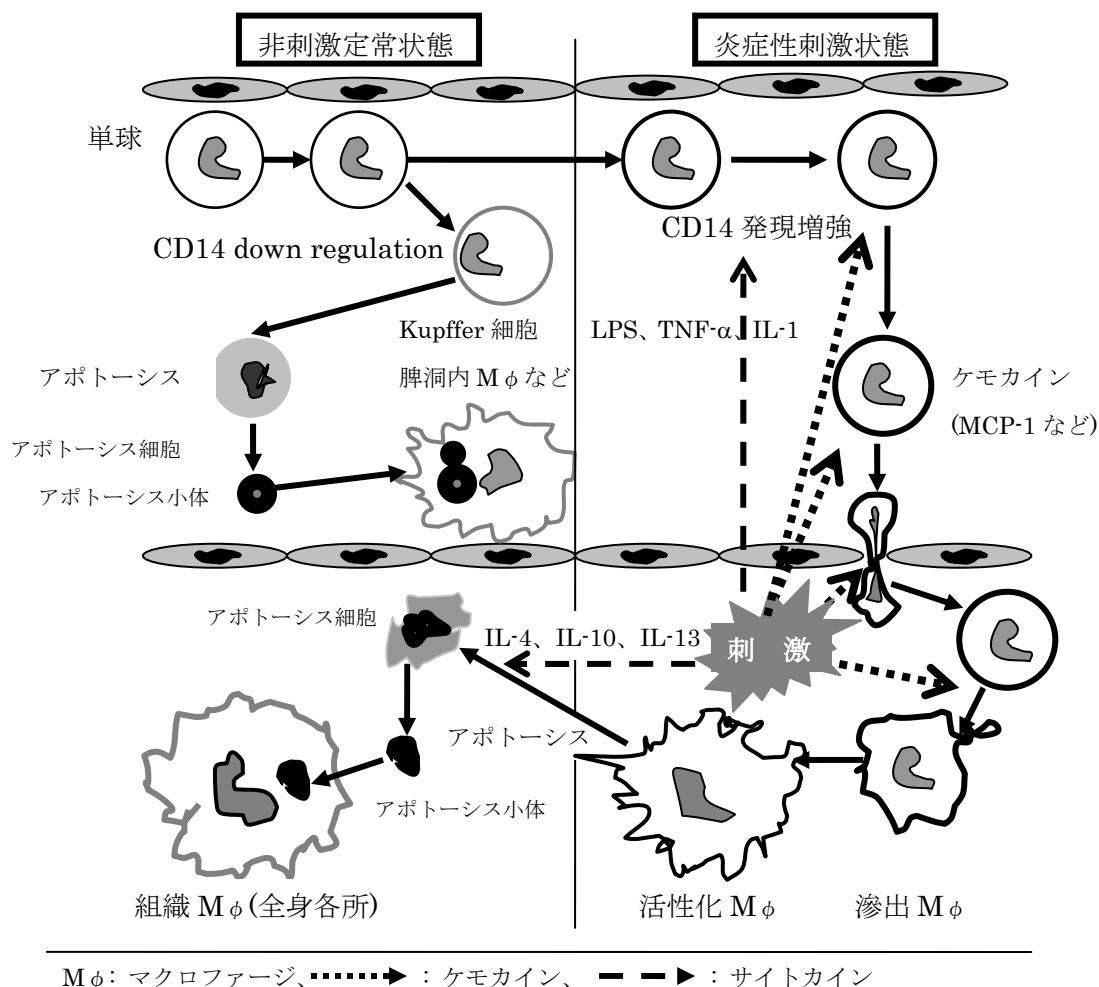
TNF- α は LPS 刺激によってマクロファージから産生されるが、CD14 欠損マウス、TLR-4 欠損マウス、C3H/HeJ マウスや C57BL/10ScCr マウスなどでは低濃度の LPS 投与に対してマクロファージからの TNF- α の産生は欠如する^{1535, 1537~1539)}。BCG 感染マウスの肝肉芽腫は局所 TNF 産生部位に一致し、TNF は肝肉芽腫を形成するマクロファージから産生される。この BCG 感染マウスにウサギ抗 TNF- α 抗体を 1~2 週間持続して投与すると、BCG 誘発肝肉芽腫の形成は劇的に抑制され、類上皮細胞の発達を欠き、牛型結核菌の排除も阻害される¹⁵⁴⁰⁾。3 週後に抗 TNF 抗体を投与すると、一旦十分発達した肝肉芽腫は急激に消

退し、TNF mRNA の発現も阻害される¹⁵⁴⁴⁾。腹腔マクロファージを TNF に暴露すると、一過性に TNF mRNA を発現し、INF- γ に反応して TNF mRNA の増加を亢進する¹⁵³⁸⁾。これらの事実から、肝肉芽腫の形成過程にある微少環境においてマクロファージから産生、分泌された TNF はオートクラインあるいはパラクライン機構を介してマクロファージの自己増殖に係わり、マクロファージの蓄積と分化を促し、細菌の排除を行っている。生理的食塩水投与対照マウスに比べて、TNF- α 受容体 I (TNF-RI) 欠損マウスや可溶性 TNF-RI 投与マウスでは、*Corynebacterium parvum* 熱処理死菌の投与あるいは BCG 生菌の感染で誘発された肝肉芽腫の形成は極度に抑制され、ラットに *C. parvum* を投与して 10~13 日頃形成された肉芽腫は可溶性 TNF-R1 の投与によって消退する¹⁵⁴⁵⁾。この研究成果から、TNF-R1 を介する TNF シグナル伝達は *C. parvum* ないし BCG 惹起肝肉芽腫発生機構に関与し、可溶性 TNF-RI は肉芽腫形成を抑制し、肉芽腫の消退に関与することが判る。

LPS 誘発 TNF- α 因子(LPS-induced TNF- α factor: LITAF)は転写因子の一つで、LPS 誘発過程で、TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現に関して情報伝達を行う。Tang ら(2006)はマクロファージからの TNF- α 、IL-6、可溶性 TNF-RII などのサイトカインの産生を欠如するマクロファージ特異的 LITAF 欠損(macLITAF^{-/-})マウスを作製し、検討した¹⁵⁴⁶⁾。その結果、LPS 刺激に対して macLITAF 欠損マウスのマクロファージでは TNF- α 、IL-1、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が低下し、野生型マウスに比べて、macLITAF 欠損マウスの致死率は極度に低下する¹⁵⁴⁶⁾。骨髓性分化因子 88(myeloid differentiation factor 88: MyD88)は TLR-2 あるいは TLR-4 などの受容体から LITAF にシグナルと仲介するアダプター蛋白質(adapter protein)で、LPS との結合後、CD14/TLR-4 認識複合体のシグナルは MyD88 を介して伝達される。MyD88 欠損マウスでは IL-1 と IL-18 との機能が欠如し、MyD88/アポ E 重複欠損マウスを高コレステロール食で飼育し、同様の条件で飼育したアポ E 欠損マウスと比較すると、MyD88/アポ E 重複欠損マウスでの粥状動脈硬化の発生は減少し、動脈硬化病変への単球/マクロファージの浸潤が阻止され、病変局所でのサイトカイン産生は低下する¹⁵⁴⁷⁾。

図 80 に示したように、無刺激定常状態では末梢血内を循環している単球は活性化されず、CD14 の発現は抑えられ、末梢血中を循環している間に刺激を受けないと、単球はアポトーシスに陥ち入り、死の運命を辿る。アポトーシスに堕ちた単球はアポトーシス小体になり、血流に常時接している Kupffer 細胞や脾マクロファージなどによって認識され、取り込まれ、処理される。この過程は老化白血球に起るアポトーシスと同じ過程で、アポトーシスに堕ちた単球はマクロファージによるアポトーシス細胞の認識と取り込みとほぼ同様の過程でマクロファージによって取り込まれ、処理される。この過程には I 型、II 型クラス A マクロファージ・スカベンジャー受容体(macrophage scavenger receptor class A, type I & II: SR-A-I, II)、クラス B スカベンジャー受容体(SR-BI) CD36、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン(ビトロネクチン受容体)、ABC トランスポーター(ATP-binding cassette transporter) ABC-1 など種々の受容体に関与する。SR-A-I, II は単球の老化に伴って細胞膜上に出現するホスファチ

図 80 末梢血中を循環している単球の運命



デールセリンと結合し、老化白血球には CD36 が関与し、単球/マクロファージに表出する CD14 はアポトーシス細胞を認識し、細胞内に取り込み、処理に関与する。この過程は LPS 刺激による CD14 を介しての活性化とは異なり、TNF- α や IL-1 などの炎症性サイトカインの産生は誘発されない^{1544, 1551, 1552}。

このように、白血球の一種である単球は、好中球と同様、骨髓で産生、末梢血中に放出され、組織に炎症性刺激が起らないと、局所では MCP-1 などのケモカインは産生されず、局所組織に侵入し、移住することない。単球は血中を循環し続け、やがて老化し、他の白血球同様に死滅する。単球の寿命が短いことは van Furth らの約 30 年に及ぶ研究成果から明らかにされ、単球が組織に侵入、移住しマクロファージに分化、成熟した場合でも半減期は長くとも 2 週間程度であって、単球の末梢血を循環する時間はマウスでは 17.4 時間、ヒトでは 71.0 時間と測定されている(「MPS 学説の提唱と概念」の「MPS の細胞回転」の項(p. 85)参照)。すでに述べた如く、CSF 産生線維肉腫株移植や連日 M-CSF 投与実験や

MCP-1 遺伝子導入マウスにおける持続性単球増多症での研究結果から末梢血単球は持続性に増加するにも拘わらず全身諸臓器、組織においては系統的な組織マクロファージの増加は起らないことが実証されている。末梢血中に持続的に増加した単球は局所に炎症性刺激がない場合、組織には単球の浸潤や単球の組織マクロファージへの分化、成熟は起らず、血管内でアポトーシスに陥ち入り、死の運命を辿る。

しかしながら、組織に炎症性刺激が発現し、局所で MCP-1 などの単球を遊走させるケモカインが産生されると、末梢血中から局所組織への単球の浸潤が起り、単球は活性化され、滲出マクロファージに分化し、活性化され、炎症性マクロファージとして種々の炎症性サイトカインを産生する。炎症が回復に向かい、炎症性刺激が減退し、消失すると、炎症性マクロファージは増殖能を失い、アポトーシスに陥ち、アポトーシス小体は別のマクロファージ、とりわけ組織マクロファージによって貪食、処理される。

b) 単球のサブセットと成熟あるいは炎症性反応

単球は骨髄から産生され、末梢血内に放出され、末梢血中を循環している単球には多様性が見られ、亜型が存在する。末梢血単球の 90～95%は CD14(LPS 受容体)と CD64(FcγRI)を発現する¹⁵⁵²⁾が、CD14 の発現の見られない単球も存在し、上述したように、それぞれ異なった運命を辿る。単球の 5～10%は CD16(FcγRIII)を発現し、CD16 陽性単球は CD14 と CD64 の発現によって CD14^{high} CD64⁺ と CD14^{low} CD64⁻との 2 つのサブセットに区別される¹⁵⁵³⁾。CD16 陽性単球は敗血症、HIV-1 感染症、結核、喘息などの多くの炎症性疾患において増加し、フラクタルカイン(CX₃CL)に反応し、血管内皮を通過し、組織内に移住する¹⁵⁵⁴⁾。CD16 陰性単球が MCP-1 に反応し、CCR2 を発現し、炎症性組織に移住するのに対して、CD16 陽性単球は CX₃CR1、CXCR-4 を発現するが、CCR2 と L セレクチン(CD62L)の発現は低く、フラクタルカイン(CX₃CL)を発現する血管内皮上で静止し、内皮表面に接着し、フラクタルカイン(CX₃CL)/ CX₃CR-1 を介して内皮下に移住する^{1555, 1956)}。

Geissmann ら(2003)は骨髄系マーカーGr-1(Ly-6C/G)を用いてマウスの末梢血を検索し、マウス単球のおおよそ 80%が Gr-1 陽性で、20%は Gr-1 陰性であることを明らかにし、Gr-1 発現状態から血液単球を 2 つのサブセットに区別した¹⁵⁵⁷⁾。Gr-1 陽性単球は CCR2⁺ CX₃CR1^{low} CD62L⁺、Gr-1 陰性単球は CCR2⁻ CX₃CR1^{high} CD62L⁻で、前者は機能的にヒトの CD14⁺ CD16⁻単球、後者は CD14⁻ CD16⁺単球に相当する。Gr-1 陽性単球は主として MCP-1/CCR2 の機序を介して炎症巣内に移住するが、CX₃CR1⁺/GFP と CX₃CR1^{GFP/GFP} 単球との混合細胞を用いた養子移入実験によって Gr-1 陰性単球はフラクタルカイン/ CX₃CR1 機序によって非炎症性組織に移住することが実証されている¹⁵⁵⁶⁾。すでに詳説したように、CX₃CR1⁺/GFP ノックイン・マウスの検討では、単球は末梢血中のみならず炎症組織内でも CX₃CR1 と GFP を発現し、局所で分化した滲出マクロファージでも同様の発現が見られ、単球と滲出マクロファージとでの遺伝子発現からも単球から滲出マクロファージへの分化が実証されている¹⁵²⁸⁾。しかしながら、肺泡マクロファージなどの組織マクロファージでは

CX₃CR1 と GFP との発現を欠き、遺伝子発現も単球・滲出マクロファージとは異なり、単球から組織マクロファージへの移行や分化は見られない¹⁵²⁸⁾。

ER-MP20(ヒト抗 CD59)は Ly 抗原の分類上 Ly-6C と呼ばれ、未熟な単球系細胞から成熟した単球に発現し、骨髄内で産生された未熟な単球における Ly-6C の発現はもっとも高く、末梢血中では骨髄から放出されたばかりの単球での Ly-6C の発現も高い。しかし、血中を循環している間に単球の Ly-6C 発現は低下する¹⁵⁵⁶⁾。すでに「組織マクロファージ除去ないし欠損マウス」の項(p. 284)で詳説した如く、MDPCl₂ 封入リポゾーム投与によって組織マクロファージは除去される。さらに、MDPCl₂ 封入リポゾーム投与によって、末梢血中の単球も除去され、単球の減少は投与後 18 時間で極限に達し、末梢血中から単球のおおよそ 90%が消失する。その後 24 時間頃から単球は回復し、3~4 日には正常に戻る¹⁵⁵⁶⁾。単球除去後 48 時間に末梢血中の単球は骨髄内単球と同様に ER-MP20(Ly-6C:ヒト抗 CD59)強陽性であるが、末梢血を循環する間に単球の Ly-6C 発現は低下し、やがて陰性化する。リステリア(*Listeria monocytogenes*)急性感染症ならびにレイシュマニア(*Leishmanai major*)慢性感染症では、ER-MP20(Ly-6C)強陽性未熟単球が炎症巣内に浸潤し、滲出マクロファージに分化する¹⁵⁵⁶⁾。

以上述べた如く、ヒトの CD14⁺CD16⁻と CD14⁻CD16⁺単球はそれぞれマウスでは Gr-1⁺と Gr-1⁻単球に相当し、Gr-1⁺単球は Ly-6C 高発現単球に包括され、これらの単球のサブセットは分化を異にする亜群と見做されている。骨髄内単球は Ly-6C の発現が高く、末梢血中に放出され、循環中単球の Ly-6C の発現は低下する。しかし、急性ないし慢性感染症では Ly-6C 高発現単球の数が増加し、炎症性組織内に浸潤する¹⁵⁵⁶⁾。このように、マウス末梢血単球には成熟段階や炎症反応の相違に基づき亜群が出現する。

c) マクロファージ・スカベンジャー受容体欠損マウス

マクロファージの果たすコレステロール代謝の重要性は 20 世紀当初 Aschoff 門下の Anitschkow (1914)¹⁴⁰⁾ によってウサギの高コレステロール食飼育実験での粥状動脈硬化症の発症に基づき最初に主張されことは、すでに「網内系の基本理念」の「Aschoff による網内系の概念の形成と提唱の沿岸」の項(p. 28)で解説した。Aschoff(1924)はコレステロール代謝機能を重視し、さらに種々の生理代謝機能を加え、網内系の重要な機能として提示した³⁾。Brown & Goldstein (1979) はヒトのリポ蛋白代謝上マクロファージ以外の種々の細胞種が保有する低リポ蛋白 (low density lipoprotein: LDL)径路とは異なり、マクロファージは LDL を取り込まないが、変性 LDL (修飾 LDL) を無制限に取り込み、細胞内に蓄積する。この径路はマクロファージ以外の細胞には存在せず、マクロファージに特有の機能であって、彼らはこの径路をスカベンジャー径路 (scavenger pathway)と呼んだ³⁴⁶⁾。その 11 年後、児玉ら(1990)は変性 LDL の一種、アセチル化 LDL(アセチル LDL)に結合する蛋白をウシ肺胞マクロファージから単離、抽出し、その分子構造を決定し、マクロファージ・スカベンジャー受容体 (macrophage scavenger receptor: MSR)を分子生物学的に実証した

表 21 スカベンジャー受容体の諸型

クラス	名称	発現細胞	主なリガンド
A	SR-A-I/II	組織マクロファージ、単球由来マクロファージ (単球には発現しない)	LDL(ac, ox, mal), AGE, フコイゲン, DS, BSA(m, mal), ポリ I/G、シリカ、 LPS, 細菌、細菌性 DNA, AP 細胞、
	SR-A-III	(細胞膜には発現しない)	老廃物など種々雑多な物質
	MARCO	脾濾胞辺縁帯マクロファージ、リンパ節の辺縁洞 や髄質のマクロファージ、肺泡マクロファージ	LPS, 細菌、(acLDL)
	SRCL-I/II	全身各所の細胞に発現	イースト菌、細菌、oxLDL、DS、 ポリ I/G
B	CD36	単球、マクロファージ、血小板、巨核球、赤 芽球、血管内皮細胞など	oxLDL、BSA(m, mal)、PS、AP 細胞、 トロンボスポンジン、コラーゲン、 長鎖脂肪酸、マラリア感染赤血球
	SR-BI	マクロファージ、肝実質細胞、副腎皮質細胞、 卵巣、精巣、脂肪組織など	HDL, LDL, oxLDL, BSA (m, mal), PS, AP 細胞
C	dSR-CI	キイロシヨジョウバエの血球、マクロファージ	acLDL、BSA(m, mal)、ポリ I/G、 フコイゲン、細菌、ラミナリン、 β -グルカン
D	マクロシアリン /CD68	マクロファージのほとんどに発現(樹状細胞や 破骨細胞を含む)、単球、好中球、好塩基球、 リンパ球、腎尿細管上皮など	oxLDL
E	LOX-1	血管内皮細胞、マクロファージ	oxLDL、ポリ I/ポリ G、AP 細胞、細菌、 熱ショック蛋白(heat shock protein)
F	SREC-I/II	血管内皮細胞、マクロファージ	acLDL、oxLDL、ポリ I/G、advillin
G	SR-PSOX	血管内皮細胞、マクロファージ、平滑筋細胞	PS、oxLDL (PSOX)、細菌
H	FEEL-1/2	単球/マクロファージ、内皮細胞(リンパ管、 血管)	cLDL、AGE、mBSA、細菌
I	RAGE	マクロファージ、単球、血管内皮細胞	AGE
J	CD163	組織マクロファージ(ヒトでは単球の 10～ 30%に発現、ラットでは陰性)	Hb/Hp 複合体

ox: 酸化、ac: アセチル化、mal: マレイル化、m: 修飾(modified)、DS: デキストラン硫酸、BSA:ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin)、AP:アポトーシス、PI:ホスファチデールイノシトール、PS: ホスファチデールセリン。Hb: ヘモグロビン、Hp: ハプトグロビン。PSOX: phosphatidylserine and lipidized lipoproteins

¹⁵⁵⁹⁾。MSR は先端部におけるチス테인・リッチ・ドメインの構造の差異から最初 I 型と II 型に区別され、その後さらに III 型や MARCO (macrophage receptors with collagenous structure)が追加された。これらの受容体の分子構造は基本的に類似することからクラス A マクロファージ・スカベンジャー受容体 (class A macrophage scavenger receptors: SR-A) として統括された。その後、SR-A とは分子構造が明らかに異なるが、変性 LDL との結合能を有する幾つかの受容体が報告され、これら受容体のあるものは内皮細胞などマクロファージ以外の細胞にも発現することから変性 LDL と結合する一群の受容体はスカベンジャー受容体 (scavenger receptors: SR)と総称され、クラス A~F に分類され^{1, 1560, 1561)}、これにクラス G、H が加えられた¹⁵⁶²⁾。さらに、グルコースと蛋白質とのメイラード(Maillard)反応に引き続き複雑な化学的修飾反応を経て形成される糖化亢進最終産物 (advanced glycation endproducts: AGE)やヘモグロビン(Hb)/ハプトグロビン(Hp)複合体に対する受容体はそれぞれ RAGE (receptors for AGE:)^{1563~1566)}、CD163^{1567~1570)}と呼ばれ、これらは変性 LDL 以外の老廃物を広く認識することから SR の亜型と見做されている(表 21 参照)。

このように、マクロファージは SR の多くを保有し、酸化 LDL などの変性 LDL ばかりではなく陰性荷電を示す多くの巨大分子を認識し、細菌を含めて種々の異物の貪食や種々の生理ないし物質代謝過程で生じた老廃物の摂取や処理にも関与する。近年、SR の分子構造で、先端部にあるシス테인の豊富なドメイン、すなわちシス테인・リッチ・ドメインは系統発生学的に古くから高度に保存され、このドメインを保有する可溶型あるいは膜結合型受容体をスカベンジャー受容体シス테인・リッチ・スーパーファミリー (scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) superfamily : SRCR-SF)と定義、命名され、SRCR-SF に属する幾多の蛋白は統括され、それらの蛋白は分子構造の差異から A 群 (group A)と B 群 (group B)とに大きく分類されている¹⁵⁷¹⁾。しかし、ここでは SR 蛋白のクラス分類に準拠してマクロファージを中心に生体内での SR の役割を SR 欠損あるいは遺伝子導入マウスでの検討成績とともに述べる。

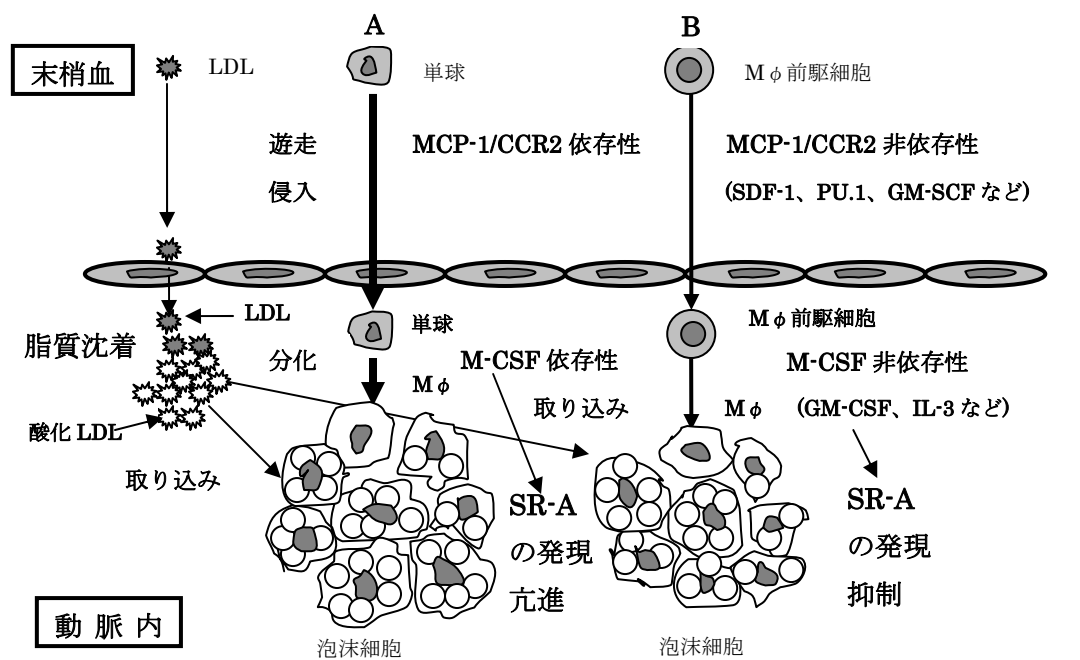
(1) SR-A-I、II 欠損マウス

Brown & Goldstein (1979)はマクロファージが生体内で LDL 代謝上スカベンジャー経路に関与し、その過程での重要な受容体としてスカベンジャー受容体(SR)を想定し、そのリガンドに当時アセチル LDL が好んで用いられた。SR はマクロファージの免疫系に関与する免疫受容体とは異なり、変性 LDL(修飾 LDL)のみならず AGE やヘモグロビン、あるいはアポトーシスなどの生理代謝処理過程に関与する非オプソニン受容体(non-opsonic receptors)である^{1, 1560, 1561)}。しかしながら、従来 SR のリガンドとして用いられたアセチル LDL は生体内に存在する物質ではなく、生体内に発生する修飾 LDL としては生体内酸化によって発生する酸化 LDL が主要な物質であり、とりわけ粥状動脈硬化症の病変内に顕著に蓄積する^{1, 1560, 1561)}。しかし、酸化 LDL の他にも、超低密度 LDL(VLDL)、レムナントリポ蛋白、塊状集合 LDL 粒子や遊離コレステロール結晶などがマクロファージに蓄積し、

AGE やヘモグロビン/ハプトグロビン(Hb/Hp)複合体、鉄などの蓄積を随伴し、泡沫細胞化する。これらの物質の蓄積は動脈硬化病変の成因や時期によって異なり、病変の陳旧化に伴って線維化や硝子化などが加味される^{1, 1560, 1561})。この過程で、動脈硬化初期病変では血中を循環している単球は活性化され、動脈壁への脂質沈着によって MCP-1 などのケモカインが産生され、単球の末梢血からの内膜への浸潤を惹起する。酸化 LDL もまた単球の遊走を促し、血管内皮細胞への接着を亢進させる。これらの機序は MCP-1 遺伝子導入アポ E 欠損マウス¹⁵⁶¹、高コレステロール食飼育 MCP-1/LDLR 重複欠損マウスあるいは CCR2/アポ E 重複欠損マウスの研究によって実証されている^{1572~1574})。酸化 LDL のみならず種々の脂質沈着によって動脈局所には種々のサイトカインや M-CSF が産生され、内膜内に侵入した単球は局所で刺激される。酸化 LDL は種々の動脈壁細胞からの M-CSF の産生を誘発し、M-CSF は侵入局所で単球から滲出マクロファージに分化を促し、細胞膜上に SR が発現し、この過程が障害されて粥状動脈硬化組織病変の発症が抑制されることは *op/op* アポ E 重複欠損マウスの検討から立証されている^{1575~1577})。しかしながら、アポ E 欠損マウスや高コレステロール食飼育 LDLR 欠損マウスに比較して、それぞれ MCP-1、CCR2、M-CSF とのアポ E 欠損や高コレステロール食飼育 LDLR 欠損重複欠損マウスの検討から立証されている^{1572~1577})。すなわち、アポ E 欠損マウスや高コレステロール食飼育 LDLR 欠損マウスに比較して、それぞれ MCP-1、CCR2、M-CSF とのアポ E あるいは高コレステロール食飼育 LDLR 重複欠損マウスにおける動脈硬化症病変の発症は強く抑制される^{1570~1577})。これに対して、病変の発症は完全には抑制されず、病変内にはマクロファージが浸潤し、このマクロファージの遊走、浸潤は MCP-1 や CCR2 に依存せず、M-CSF 非依存性で、M-CSF 以外の GM-CSF、IL-3 など単球以前の分化段階にあるマクロファージ前駆細胞からマクロファージに分化し、造血前駆細胞に由来する細胞群と見做される。このように、動脈硬化病変内には末梢血中の単球以外にも単球の浸潤とは異なった機序によって浸潤、移住するマクロファージ前駆細胞の関与が見られる(図 81 参照)。

マウスでマクロファージは M-CSF によって SR-A-I、II の産生を選択的に増加させ、これらの受容体のマクロファージ細胞膜面への局在を誘導し、細胞外からの酸化 LDL のマクロファージへの取り込みを促進させる^{1, 1560, 1561, 1576})。これとは対照的に、GM-CSF はヒト単球由来マクロファージでの SRA-I、II の発現を低下させ¹⁵⁷⁸)、WHHL(Watanabe heritable hyperlipedemic) ウサギの粥状動脈硬化病変の進展を阻止する¹⁵⁷⁹)。このように、M-CSF と GM-CSF とは SR-A-I、II の発現に対して逆の効果を示し、前者は動脈硬化症の発症を促進させ、後者は抑制する。SRA-I、II はマクロファージの細胞膜上に局在し、受容体として機能するが、SR-A-III は細胞内の小胞内に存在し、細胞膜へは移行せず、受容体としての機能を発揮しない。SR-A-III が転写されると、SR-A-I、II の発現を抑制し、負の調節を行っている¹⁵⁸⁰)。2F8 は抗マウス SR-A モノクローナル抗体で、SR-A の α -helical coiled coil ドメインを認識し、2F8 を投与すると、マクロファージの接着が抑制されることから、このドメインを介して SR-A-I、II は接着に関与する¹⁵⁸¹)。SR-A-I、II は幅の広い多様なリガ

図 81 スカベンジャー受容体を主とする遺伝子欠損マウスを用いての粥状動脈硬化症の発生機序とマクロファージ亜群の関与*



* **A:** アポ E 欠損マウス、高コレステロール食飼育 LDLR 欠損マウス、**B:** MCP-1 遺伝子導入アポ E 欠損マウス、高コレステロール食飼育 LDLR/MCP-2 重複欠損マウス、アポ E/CCR2 重複欠損マウス、*op/op* アポ E 重複欠損マウス、高コレステロール食飼育 LDLR/MSRA-I, II 重複欠損マウス、アポ E/MSRA-I, II 重複欠損マウスなどの研究成績を基盤に作製、Mφ: マクロファージ

ンドとの結合性を示し、アセチル化 LDL、マレイル化 LDL、酸化 LDL などの変性 LDL、AGE、細菌成分である LPS やリポタイコ酸など、あるいは種々の陰性荷電巨大分子を認識し、動脈硬化症におけるマクロファージの泡沫細胞化、異物、老廃物、アポトーシス細胞の貪食、摂取、処理、あるいは生体防御機構への参画に重要な役割を果たしている^{1, 1560, 1561, 1581~1590}。

SR-A-I, II(CD204)はヒト、ウシやマウスでは無刺激定常状態において Kupffer 細胞、肺胞マクロファージ、脳内血管周囲マクロファージ(間藤細胞)など全身各所組織に常在する組織マクロファージにも発現し、個体発生学的に卵黄嚢での原始造血に発生する胎生マクロファージにも発現する他に¹⁾、刺激時発生する単球由来のマクロファージにも発現する。しかし、単球には SR-A-I, II は発現しない。粥状動脈硬化初期病変では泡沫細胞は SR-A-I, II を発現し、酸化 LDL などの変性 LDL の摂取に関与し、単球由来のマクロファージは主役を演じると推定される。筆者は 1990 年以降東京大学児玉龍彦教授らと SR-A-I, II に関してヒト、ウシ、マウスを含めて多方面からの共同研究を行った^{1560, 1561, 1582~1590}。その中で、鈴木らの作製した SR-A-I, II 欠損マウスとアポ E 欠損マウスや LDL 受容体(LDLR)欠損マウスとを交配させ、SR-A-I, II/アポ E あるいは SR-A-I, II/LDLR 重複欠損マウス

を作製し、SR-A-I、II/LDLR 重複欠損マウスには高コレステロール食を与えて飼育し、これらの重複欠損マウスとアポ E 欠損マウスや高コレステロール食飼育 LDLR 欠損マウスとを大動脈起始部における動脈硬化病変の発生状態を比較、検討した。その結果、SR-A-I、II/アポ E 重複欠損マウスでの動脈硬化病変の発生はアポ E 欠損マウスと比べて、著しく抑制され、SR-A-I、II/LDLR 重複欠損マウスでも LDLR 欠損マウスに比べて、動脈硬化病変の発生は軽度で、これらの研究成績は動脈硬化症の泡沫細胞は末梢血中を循環する単球に由来するマクロファージで、酸化 LDL を主とする変性リポ蛋白を取り込む SRA-I、II の発現が重要な役割を演じていることを提示している¹⁵⁹⁰⁾。しかし、これら二つのマウスモデルでは、SR-A-I、II の欠損にもかかわらず動脈硬化初期病変の発生が完全に抑制されず、病変内の泡沫細胞は 2F8 陰性であるが、MARCO やクラス B SR の CD36、SR-BI、クラス C の CD63/マクロシアリンの発現が証明され、これら MSRA-I、II 以外の受容体の関与が推定された。MARCO は SR-A-I、II、III と基本的分子構造は類似するが、コラーゲン性ドメインが長く、 α -helical coiled coil domain を欠如し、無刺激定常状態では、脾濾胞辺縁帯マクロファージ、リンパ節の辺縁洞や髄質のマクロファージ、一部の腹腔マクロファージ、肺泡マクロファージ、肝 Kupffer 細胞に発現する^{1238, 1591, 1592)}。この受容体は細菌性抗原や中性多糖対と選択的に結合し、LPS 刺激時では腹腔マクロファージ、肺泡マクロファージ、肝 Kupffer 細胞に発現が亢進し、単球由来のマクロファージにも発現し、細菌感染に対して宿主の防衛機構に役割を演じるが、マウスで高コレステロール食飼育によるコレステロール負荷時にも増強する^{1, 1560, 1561, 1593)}。

筆者らは後述する如く、SR-A-I、II 欠損マウスでの *C. parvum* 死菌の投与による肝肉芽腫形成実験を行った。その結果、SR-A-I、II 欠損マウスでの肝肉芽腫形成は野生型マウスよりも遅延し、肝臓での炎症性肉芽腫マクロファージからの MCP-1、TNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインの産生に障害があり、これは既存のマクロファージにおける SR-A-I、II の欠損に起因する。同時に、SR-A-I、II の欠損に因って、これら炎症性サイトカインの産生に必要なシグナル伝達が作動せず、肝肉芽腫形成初期での末梢血単球の遊走と補充、マクロファージへの分化や活性化、マクロファージ細胞相互の接着や集合、肉芽腫内でのマクロファージによる病原体の貪食や処理が障害され、肉芽腫の消退も遅延し、肉芽腫の形成は持続し、慢性化する¹⁵⁹³⁾。しかし、SR-A-I、II 欠損マウスで形成される *C. parvum* 死菌惹起肝肉芽腫の中心には野生型マウスの肝肉芽腫よりも壊死が多発する。SR-A-I、II 欠損マウスにザイモセル(β -グルカン)を静注し、発生させた肝肉芽腫内に集簇したマクロファージはルーズで、緻密な肉芽腫を形成せず、これらの知見は SRA-I、II の欠損による接着障害によるものである¹⁵⁹³⁾(「肉芽腫形成におけるマクロファージの実験的解析」の項(p 336)参照)。

以上述べた SR-A-I、II 欠損マウスにおける知見からも明らかな如く、動脈硬化症の発症や炎症性肉芽腫形成実験で SR-A-I、II の重要性が実証され、酸化 LDL、AGE、修飾 BSA、老廃物などの生理学的ならびに物質代謝過程における SR-A-I/II の重要性が SR-A-I、II 欠

損マウスでのこれらの物質のクリアランス低下からも実証されている。

(2) SR-B 遺伝子導入ないし欠損マウス

CD36 はクラス B スカベンジャー受容体 SR-B に属し、単球、マクロファージ、血小板、巨核球、赤芽球、血管内皮細胞のどに発現する^{1560, 1561, 1594, 1595}。前単球から単球への分化、前巨核球から巨核球への分化に伴って CD36 の発現は増強し、逆に赤芽球系列では分化に伴って CD36 の発現は低下する¹⁵⁹⁶。このように、単球系細胞から単球由来のマクロファージへの分化過程で CD36 の発現が増強し、ヒトの動脈硬化症の泡沫細胞では SR-A-I/II の発現よりも CD36 が強く表出され¹⁵⁹⁷、ヒトの CD36 欠損症では高齢者でも動脈硬化症の発症は起らない¹⁵⁶¹。CD36/アポ E 重複欠損マウスでは、アポ E 単独欠損マウスに比べて、高コレステロール食飼育によって発症する動脈硬化症は 70%低下する。これらの事実から CD36 は動脈硬化症の発症へ関与することが立証される^{1598, 1599}。分子構造上 CD36 に相同性を有する SR-BI は進化の過程で良く保存され、多くの哺乳動物では脳、腸管、マクロファージ、血管内皮細胞、角質細胞、肝実質細胞、副腎皮質細胞、卵巣、精巣、脂肪組織、ヒト胎盤などに発現する。SR-BI は CD36 と同様に酸化 LDL、変性 BSA、ホスファチジルセリン、アポトーシス細胞など種々のリガンドと結合するが、これら二種類の受容体はそれぞれ特異な脂質運送機能を示し、CD36 は長鎖脂肪酸の摂取を促進させ、SR-BI は HDL 粒子からのコレステロールならびにコレステロールエステルの運送を仲介する¹⁶⁰⁰。HDL は CD36 の発現を抑制する¹⁶⁰¹。

マウス・リコンビナント SR-BI を組み込んだアデノビルスを投与し^{1602, 1603}、あるいは SR-BI 遺伝子を導入^{1600, 1601}した高脂食ないし高コレステロール食飼育 LDL 受容体欠損マウスでは、同様の条件で飼育した LDL 受容体欠損マウスに比べて、肝臓に SR-BI の過剰産生、血漿 HDL コレステロール値の低下、初期ならびに進行性病変とも動脈硬化症の有意な低下を招く^{1602~1607}。すなわち、SR-BI 遺伝子導入 LDL 受容体欠損マウスの肝臓での SR-BI の過剰発現は血漿 HDL の著しい低下を伴い、血漿 HDL の平均値は動脈硬化症の範囲や進行状態と平行し、末梢組織からの肝臓への HDL/コレステロール運送を促進し、動脈硬化症の発症ならびに進行は抑制される^{1600~1607}。動脈硬化症の局所病変でのマクロファージにおける SR-BI の発現の重要性は SR-BI/アポ E 重複欠損マウスやアポ E 単独欠損マウスから採取した骨髓細胞を X 線の致死量照射アポ E 欠損マウスに移植して作製されたマクロファージに SR-BI の発現の有無を示すアポ E 欠損マウスにおける動脈硬化症の解析によって実証され、マクロファージに SR-BI に発現を欠くアポ E 欠損マウスに自然発症する動脈硬化症は、SR-BI を発現したアポ E 欠損マウスに比べて、86%の増加を示すが、これらのマウスでは血漿リポ蛋白、ことに HDL やその分画には差異がない¹⁶⁰⁶。しかし、SR-BI の欠損はアポ E 欠損マウスで閉塞性冠状動脈疾患を急激に発症し¹⁶⁰⁷、これらの事実は動脈硬化症や閉塞性冠状動脈疾患の発症は HDL の輸送あるいは流出(efflux)の抑制によるものではなく、局所に浸潤したマクロファージに発現する SR-BI は動脈硬化症や閉塞性冠状

動脈疾患に対して抑制効果を呈示している。

Huby ら(2006)は SR-B1 欠損マウス、loxP 部位挿入による SR-BI 遺伝子ターゲティングで倭小対遺伝子(hypomSR-BI)を組み込んだ SR-BI コンディショナル・ノックアウトマウス(hypomSR-BI マウス)や Cre/loxP 法で肝臓に hypomSR-BI を組み込んで SR-BI 遺伝子を不活性化した hypomSR-BI KO^{liver} マウスを作製し、高脂肪食で飼育し、これらの遺伝子改変マウスにおける動脈硬化症の発症状態を比較、検討した¹⁶⁰⁸⁾。その結果、高脂肪食飼育正常対照マウスに比べて、hypomSR-BI マウスにおける動脈硬化症の発症は 2.5 倍に亢進するが、hypomSR-BI KO^{liver} マウスと SR-BI 欠損マウスでの動脈硬化症の発症はそれぞれ 32 倍、48 倍と著しく亢進した¹⁶⁰⁸⁾。しかし、SR-BI 欠損マウスに比べて、hypomSR-BI KO^{liver} マウスでは動脈硬化症の発症は低く、これは動脈硬化病変でのマクロファージの減少と平行する¹⁶⁰⁸⁾。以上の知見から、SR-BI は肝臓における動脈硬化症の抑制効果に加えて、肝外組織でも局所のマクロファージに発現する SR-BI が動脈硬化症を防ぐ役割を演じていると推定される。

(3) その他の SR について

クラス C SR(SR-C)はキイロショウジョバエで発見され、dSR-CI と呼ばれ、ショウジョバエの胎生ならびに幼生の発育過程で、血球やマクロファージに発現し、アセチル LDL や細菌と結合する^{1609, 1610)}。クラス D SR(SR-D)は CD68、Lamp (lysosomal membrane glycoprotein)遺伝子産物、マクロシアリンからなり、CD68/マクロシアリンは樹状細胞や破骨細胞を含めて生体各所のマクロファージに広く発現し¹⁶¹¹⁾、培養では酸化 LDL と結合するが¹⁶¹²⁾、マウスの生体内ではマクロシアリンは酸化 LDL との結合上直接的な役割を果たしていない¹⁶¹³⁾。

以上生体内で主として酸化 LDL を認識し、結合する 8 つのクラスの SR のうち、今日まで明らかにされている SR 欠損ないし遺伝子導入マウスの知見を中心に SR の生体内での役割に関して解説した。SR-A-I、II は極めて多種類のリガンドに結合し、無刺激定常状態では、生体内で生じた酸化 LDL を始め種々の老廃物やアポトーシス細胞などの摂取や処理に当たるが、その他にも種々の機能を演じ、感染防御作用にも関与する。SR-A-I、II は専ら全身各所の組織マクロファージに発現するが、単球には発現しない。しかし、刺激によっては単球由来のマクロファージにも SR-A-I、II が発現する。基本的な分子構造が SR-A-I、II に類似する MARCO はむしろ感染防御の機能に関与し、非刺激状態でも感染性抗原に接触し易い部位の細胞に発現するが、腹腔マクロファージの一部を除き、全身各所の組織マクロファージには発現しない。しかし、LPS 刺激によって組織マクロファージにも MARCO が発現する。クラス B-SR (SR-B)に属する CD36 や SR-BI はともに種々の細胞種に発現し、単球/マクロファージでの CD36 の発現は動脈硬化症の発症と進行を促すが、SR-BI は末梢性組織から肝臓への HDL コレステロールの逆運送機構に重要で、肝臓での発現亢進は動脈硬化症の発症を抑制し、動脈硬化病変局所での浸潤マクロファージにおける SR-BI の発現

は動脈硬化症の進展を抑える。その他、クラス C(dSR-CD)、クラス D(マクロシアリン/CD68)、クラス E(LOX-I, II)、クラス F(SREC-I, II)、クラス G(SR-PSOX)、クラス H(FEEL-1/FEEL-2)などの SR に関しての遺伝子導入ないし欠損マウスによる生体内での機能的解明は十分ではない。

さらに、SR としては、RAGE (receptor for AGE)は AGE の受容体、CD163 はヘモグロビン(Hb)の受容体として知られ、RAGE の生体内の SR としての役割に関しては、アポ E 欠損マウスにストレプトゾトシン(streptozotocin)を投与し、糖尿病を発症させると、動脈硬化症はさらに亢進するが、可溶性 AGE を腹腔内に連続投与すると、動脈硬化症の亢進は有意に抑制される¹⁶¹⁴。インスリン・プロモターを組み込んだ誘導型一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase: iNOS)遺伝子の導入によって作製した I 型糖尿病 マウスに RAGE 遺伝子を導入した I 型糖尿病/RAGE 重複遺伝子導入マウスの解析では、糖尿病性腎症が発症し、増悪し、RAGE の過剰発現によって糖尿病が進行し¹⁶¹⁴、逆に、RAGE 欠損マウスでは糖尿病性腎症は抑制され^{1615, 1616}、さらに破骨細胞の発達が抑制され、骨質の増加と硬化を惹起し、RAGE は AGE との結合を介して破骨細胞の発達を促し、骨質を減少させ、骨粗鬆症を発症する¹⁶¹⁷。RAGE の他に SR-A-I, II、CD36、SR-BI、LOX-1、FEEL-1/FEEL-2 などの種々の SR が AGE に結合し、多種類の受容体が関与する¹⁵⁶⁶。

CD163 は SRCR スーパーファミリーの B 群に包括され¹⁵⁷¹、無刺激定常状態での全身各所に常在する殆どの組織マクロファージに発現し^{1618, 1619}、ヒトではその他に末梢血単球でも約 10~30%に発現する^{1618, 1619}。この受容体はラットでは ED2 と呼ばれ、専ら組織マクロファージに発現し、ラットの組織マクロファージのマーカーとして有用されるモノクローナル抗体である。しかし、ラットでは末梢血中の単球には発現しない(「いわゆる“滲出・在在マクロファージ”について」ならびに「二重酵素細胞化学的ないし免疫細胞化学的解析」の項(p. 96, p. 98)参照)。CD163 は Kristiansen ら(2001)によって Hb の SR として同定され¹⁵⁶⁷、生理学的な赤血球の崩壊過程で生じた Hb は肝マクロファージ(Kupffer 細胞)、赤脾髄マクロファージ、骨髄マクロファージなどを主とする組織マクロファージによって取り込まれ、Hb/Hp 複合体の受容体である¹⁵⁶⁹。この過程の亢進によってを惹起される血鉄症(hemosiderosis)や血色症(hemochromatosis)などの過剰鉄蓄積症では、単球においても CD163 の発現が亢進し、単球由来のマクロファージにも CD163 が発現する^{1570, 1618~1620}。筆者が Zeng や Takeya ら(1996)とともに報告した AM-3K¹²³⁵はヒトの組織マクロファージに特異的なモノクローナル抗体はヒト以外の種々の哺乳動物とも交叉反応を示し、結核症、サルコイドーシス、異物肉芽腫などの肉芽腫性疾患、動脈硬化症やその他の代謝異常症を含めて種々の病態でのマクロファージの特異な亜群を認識し、ラットで報告された ED2 や KiM2R に符合する。Komohara ら(2006)は AM-3K が CD163 を認識し、単球由来のマクロファージに代表される炎症性マクロファージとは異なる抗炎症性マクロファージのマーカーであることを明らかにした¹⁶²⁰。

上述した如く、無刺激定常状態では CD163 は生体防衛上第一線に在在する組織マクロフ

ファージに強く発現し、ラットでは単球には発現しない。しかし、ヒトでは CD163 は約 10～30%の単球に発現し、グルコシルコリチンととともに培養すると、単球の約 90%に発現する。しかし、生体内では急性炎症の初期で局所に侵入したばかりのマクロファージには CD163 は発現せず、急性炎症の治癒過程、慢性炎症、創傷治癒過程においては CD163 陽性マクロファージが出現する^{1618, 1619}。このように、CD163 は無刺激定常状態での組織マクロファージの多くに発現し、Hb/Hp 複合体の処理を介しての赤血球の崩壊処理と鉄代謝過程での SR の役割を演じ、炎症の消散過程において CD163 陽性マクロファージが出現、増加し、炎症を抑制する役割を演じる。無刺激定常状態で全身各所の組織に分布する CD163 陽性マクロファージは炎症性刺激状態で発生する単球由来の滲出マクロファージないし炎症性マクロファージとは異なった機能的役割を演じる細胞群と見做される。

d) 小括：マクロファージ受容体の発現における差異とマクロファージの亜群について

マクロファージは免疫機能を始めとする生体防衛機構のみならず多様な生理代謝機能を営み、種々の刺激に反応して機能が発現、亢進し、あるいは無刺激状態でも機能は発現し、これらの機能発現には幾多の受容体が関与する。CD14 は LPS 刺激に反応し、単球/マクロファージを始め顆粒球やリンパ球に発現し、単球/マクロファージを活性化する。CD14 遺伝子導入マウスや CD14 欠損マウスで実証されたように、CD14 陽性単球/マクロファージは LPS 刺激で TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインを産生し、炎症性マクロファージとしての機能を発揮する。これに対して、CD14 陰性単球は末梢血を循環中に LPS 刺激を受けず、活性化されないと、アポトーシスに陥ち、死滅する。ヒトでは CD14、CD16 の発現、さらにマウスでは Gr-1 の発現によって単球は二つの亜群に分けられる。CD14、Gr-1 の発現する単球は末梢血単球の約 3 分の 1 を占め、MCP-1/CCR2 の反応機序を介して炎症性組織に移住するのに対して、CD16 陽性 Gr-1 陰性単球は炎症組織あるいは無刺激定常状態で構成的に産生されるフラクタルカインに反応し、CX₃CR 発現し、組織に移住する。これに対して、肺胞マクロファージを始め組織マクロファージは CX₃CR を発現せず、他の遺伝子発現も単球とは異なり、無刺激定常状態での単球から組織マクロファージへの分化は起らない。

無刺激定常状態では、SR-A-I、II や CD163 は全身各所の臓器、組織に分布する組織マクロファージに発現する。しかし、CD163 はヒトの単球では約 10～30%に発現するが、無刺激状態ではラットの単球には CD163 の発現は見られず、SR-A-I、II も単球には発現せず、これらの受容体は専ら組織マクロファージに広く発現し、胎生早期の卵黄嚢造血に初発する原始/胎生マクロファージにも発現する。しかし、刺激が加わると、SR-A-I、II や CD163 は単球ないし単球由来のマクロファージでも発現する。SR-A-I、II と同属の MARCO は無刺激定常状態では脾辺縁帯マクロファージやリンパ節辺縁洞マクロファージに局限して発現するが、脾周辺帯やリンパ節の辺縁洞は刺激状態にあり、LPS 刺激では肺胞マクロファージや肝臓の Kupffer 細胞にも MARCO が発現する。このように、刺激状態では単球由来

のマクロファージに SR-A-I、II や CD163 が発現するが、無刺激定常状態では専ら全身各所の組織マクロファージに発現し、LPS 刺激によって発現する単球由来の CD14 陽性マクロファージとは異なり、無刺激定常状態での受容体の発現からマクロファージ亜群が識別される。

5) 肉芽腫形成におけるマクロファージの実験的解析

「マクロファージの発生と分化に関する実験的解析」の項(p. 254)で検討した如く、マクロファージには亜群が存在し、これら亜群に発現する受容体には差異が見られ、遺伝子改変マウスの検討から、単球由来のマクロファージと全身各所に分布する組織マクロファージとが識別されることを詳述した。さらに、すでに「刺激によって発生、分化するマクロファージ」の項(p. 248)で述べた如く、肉芽腫性病変には単球由来の滲出マクロファージが浸潤し、炎症性マクロファージとして関与し、とりわけ炎症初期に重要な役割を演じることは古くから Sabin ら (1924)¹⁰⁷⁾、天野 (1948)^{164, 165)} によって主張され、van Furth ら (1970, 1972)の MPS 学説^{4, 5, 423~427)}によって確実になった。全身各所の臓器、組織には組織マクロファージが常在し、生体防御の最前線に位置し、外界から侵入する病原体や異物に反応する。炎症が慢性化すると、とりわけ肉芽腫性炎症では組織マクロファージが増殖し、増加する。筆者らは 1980 年代の中頃から約 15 年間主として肝臓における実験的肉芽腫実験でマクロファージの動態を ⁸⁹Sr 投与極度単球減少症惹起マウス、*op/op* マウスを中心に GM-CSF 欠損マウス、SR-A-I、II 欠損マウス、IL-5 遺伝子導入マウスやヌード・マウス、SCID マウス、*xid* マウスなど種々の遺伝子異常マウスを用いて追求した⁴⁸⁸⁾。

内藤ら(1996)によって行われた MDPCl₂ 封入リポゾーム投与による Kupffer 細胞除去マウスの一連の研究で¹³⁴³⁾、Moriyama ら(1997)は Kupffer 細胞除去マウスにザイモサン(β -glucan)の投与に形成される肝肉芽腫を検討した¹³⁴²⁾。通常マウスにザイモサンを投与すると、好中球の浸潤に続き、3 日頃から肝類洞内に肉芽腫が形成され、約 1 週後増加は顕著となり、10 日頃をほぼピークに達し、約 1 週間維持される。投与後 2 週頃から肉芽腫の数と大きさは減少の一途を辿り、28 日には肉芽腫はほぼ消失する。ザイモサン投与の直前に MDPCl₂ 封入リポゾームを投与すると、Kupffer 細胞は 3 日では対照正常マウスの約 12% まで減少し、肝肉芽腫の形成は見られず、ザイモサン投与後 5 日で少数かつ小型ながら肝肉芽腫が形成される¹³⁴²⁾。投与後 7 日以降肝肉芽腫の数は増加し、10 日でピークにその後減少の一途を辿る。しかし、数がピークに達する投与後 10 日でも対照マウスで形成される肝肉芽腫の約半数で、その大きさも対照マウスよりも小型である¹³⁴²⁾。このように、Moriyama ら(1997)によると、Kupffer 細胞除去マウスではザイモサン惹起肝肉芽腫の形成が遅延し、障害されるが、肝肉芽腫の形成には既存の Kupffer 細胞が不可欠であると見做された。

ザイモサン惹起肝肉芽腫の形成過程で、Moriyama ら(1997)は末梢血から単球ならびに単球系細胞以前の分化段階のマクロファージ前駆細胞の肝肉芽腫病変内への浸潤、増殖なら

びにマクロファージへの分化が種々のモノクローナル抗体を用いて解析した¹³⁴²⁾。その結果、ER-MP20(Ly-6C: ヒト抗 CD59)陽性単球や ER-MP58 陽性マクロファージ前駆細胞の肉芽腫への浸潤は対照マウスではザイモサン投与後 10 日まで増加傾向を示すのに比べて、MDPC12 封入リボゾーム投与マウスでは低く、Kupffer 細胞が除去されると、単球やマクロファージ前駆細胞の病変内への浸潤は低下した¹³⁴²⁾。肝肉芽腫形成の過程で、対照マウスでは M-CSF、IL-1、MCP-1、TNF- α 、IFN- γ mRNA の発現が亢進するのに対して、Kupffer 細胞除去マウスでは M-CSF mRNA 以外のサイトカインの発現は抑制される。しかし、M-CSF mRNA の発現は対照マウスでも亢進し、Kupffer 細胞除去マウスでも対照マウスと同様に肝臓局所での M-CSF の産生は亢進した¹³⁴²⁾。血清中の M-CSF 値はザイモサン投与後 1 日をピークに一時的に増加し、それは Kupffer 細胞除去マウスで顕著で、肝臓局所で産生された液性 M-CSF の血中増加に起因する。肉芽腫内ならびに周囲の細胞増殖状況を³H-サイミジン標識率で調べると、対照マウスでは肉芽腫マクロファージ、単球、マクロファージ前駆細胞のザイモサン投与後 10 日までは³H-サイミジン標識率はいずれも 10%程度あるいはそれ以下であるのに対して、Kupffer 細胞除去マウスでは単球に比べて、マクロファージ前駆細胞の示す³H-サイミジン標識率の増加が最も顕著で、肉芽腫内では 5 日、肉芽腫周囲では 7 日でピークに達し、このマクロファージ前駆細胞の増殖と肉芽腫病変内外のマクロファージの増殖率と平行し、マクロファージ前駆細胞の増殖と肉芽腫マクロファージの増加とは連動した¹³⁴²⁾。他方、単球は Kupffer 細胞除去マウスでも肉芽腫病変へ浸潤し、ER-MP20(Ly-6C: ヒト抗 CD59)、BM8 陽性の滲出マクロファージへと分化するが、その³H-サイミジン標識率は 3 日で 10%を越える。しかし、それ以降の³H-サイミジン標識率は減少の一途を辿る¹³⁴²⁾。以上の研究成績から、Moriyama ら(1997)は Kupffer 細胞除去マウスでは、肉芽腫性病変へ動員されたマクロファージ前駆細胞が局所で増殖し、ザイモサン投与後の肝肉芽腫形成に重要な役割を演じていることを指摘した。

以上述べた如く、Kupffer 細胞除去マウスにおける肉芽腫マクロファージの解析から van Furth らの MPS 学説で主張された単球由来の滲出マクロファージが動員され、炎症性マクロファージとして関与する以外に、単球系細胞以前の分化段階から由来する ER-MP58 陽性マクロファージ前駆細胞が動員され、肝肉芽腫病変内外で分裂して数を増し、マクロファージへと分化する過程が存在し、この過程には局所で産生される M-CSF の作用が重要である。このように、正常対照マウスに比べて、Kupffer 細胞除去マウスでは、ザイモサン投与による肝肉芽腫の形成は抑制され、炎症性サイトカインの産生も低下し、炎症は軽減する。しかし、生きた病原体の感染では事情は著しく異にする。内藤(2007, 2008)や Ebe ら(1999)の Kupffer 細胞除去マウスにリステリア菌を投与すると、マウスは感染し、3 日以内にすべて死亡する。これらの感染動物の肝臓や脾臓では、リステリア菌の増殖が顕著で、好中球の高度な浸潤を惹起し、MIP-2 の産生が亢進し、肝細胞はアポトーシスに陥り、死滅する^{1343, 1621)}。このように、肝臓では Kupffer 細胞は肝細胞への細菌感染を防御し、生体での第一線で生体防御機構を担っている。

Duffield ら(2005)はデフテリア毒素(DT)と細胞内酵素活性欠如変異 DT(DT^{mut})の受容体(DTR、DT^{mut}R)と CD11b との CD11b-DTR コンストラクトを用いて作製した遺伝子導入マウスに無菌チオグリコレート(Brewer's thioglycolate: BTG)を腹腔内に注射し、6 時間後に DT を注射すると、単球/マクロファージはアポトーシスに陥り、24 時間後には極度に減少し、マクロファージは枯渇する¹³³²)。しかし、CD11b-DTR 遺伝子導入マウスでは、好中球は DT に対して感受性を欠き、アポトーシスに陥ることはないので、BTG 刺激によって滲出する腹腔細胞の殆どは好中球である。CD11b-DTR 遺伝子導入マウスに四塩化炭素(CCl₄)を投与し、肝線維化を惹起させ、その過程を解析すると、肝損傷期と回復期には肝線維化に関連するマクロファージ、すなわち、瘢痕関連マクロファージ(Scar-associated macrophages: SAM)が発生する¹³³²)。このマクロファージには機能的に異なった 2 種類の亜群が識別される。その一つは単球由来の滲出マクロファージあるいは炎症性マクロファージであって、Th 1 リンホカイン、細菌性ないし真菌性細胞壁成分や分解された間質基質などで活性化され、炎症性サイトカインあるいはケモカインを産生、放出し、古典的活性化マクロファージ(classically activated macrophages)と呼ばれる^{1332, 1622, 1623})。その他のマクロファージの供給源は肝臓の在住マクロファージ、すなわち Kupffer 細胞と見做され、この細胞群は IL-4 などを含む Th2 リンホカイン、副腎皮質ホルモンやアポトーシス細胞によって活性化され、IL-10、IL-13、TGF- β などの抗炎症性サイトカインを産生する。この過程は代替的活性化(alternative activation of macrophages)と呼ばれる^{1332, 1622, 1623})。

このように、滲出マクロファージ、すなわち炎症性マクロファージは早期の肝損傷期に出現し、末梢血から侵入した単球から分化し、炎症反応を亢進し、やがてアポトーシスに陥る。これに対して、炎症の回復期に出現し、組織の修復に関与するマクロファージは局所の在住肝マクロファージ、すなわち Kupffer 細胞の活性化し、局所在住マクロファージの、主として増殖によって出現し、抗炎症性反応を発揮し、炎症反応を抑制し、代替的活性化マクロファージ(alternatively activated macrophages)と呼ばれる^{1332, 1622, 1623})。以上述べたように、Duffield ら(2005)は CD11b-DT 遺伝子導入マウスでの肝マクロファージの選択的枯渇状態における CCl₄ 惹起肝線維化過程の解析で、機能的に異なった 2 群のマクロファージが発生し、両細胞群は相互に機能を補足し合って、炎症を終息へと導く¹³³²)。

Goerdt & Orfanos (1999)は古典的活性化マクロファージが IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α の作用によって惹起され、古典的活性化マクロファージはケモカイン MIP-1 α を分泌し、Fc γ 受容体(Fc γ R1(CD64)、Fc γ RII(CD32)、Fc γ RIII (CD16))を保有するのを明らかにした¹⁶²²)。これに対して、代替的活性化マクロファージは IL-1 アンタゴニスト、IL-4、IL-13 などの作用によって活性化され、Fc ϵ R(CD23s)、マンノース受容体(CD206)、スカベンジャー受容体(CD204)、 β -グルカン受容体、CD163 (RM3/1: Hb/Hp 受容体)を保有し、両細胞群は分子レベルでのレパートリーを異にする¹⁶²²)。すなわち、前者は単球に由来する滲出ないし炎症性マクロファージの活性化によるもので、初期の炎症反応に関与し、炎症を亢進し、生体内に侵入した病原体や腫瘍細胞を除去し、Th1 型免疫反応を亢進し、M1 マクロファージと

も呼ばれている。後者は受容体の面から組織マクロファージに共通し、組織マクロファージの活性化されたもので、炎症に対して抑制的に作用し、抑制マクロファージ(suppressor macrophages)とも呼ばれる。このマクロファージは M2 マクロファージとも呼ばれ、炎症の吸収、消散、治癒過程に作用し、炎症性刺激に対する反応性の低下を示し、組織碎片除去、血管新生、組織改築、創傷治癒に関与し、Th2 型免疫反応を促進する^{1622~1629}。IL-4 受容体 α 欠損マウス(LysM(Cre)IL-4R α (-/flox) mice)はマンソン住血吸虫症の急性感染症ですべて死亡し、Th2 免疫反応、マクロファージによる肉芽腫反応、虫卵誘発線維化が欠如し、Th1 サイトカインの増加、肝臓や腸管の損傷、敗血症などが死因と見做される¹⁶²⁷。Src 相同ホスファターゼ(Src homology phosphatase: SHP)欠損マウスでは、マクロファージの M2 への傾斜が報告され、SHP は生体内での M2 マクロファージの発生上負の調節因子と考慮されている¹⁶²⁸。

このようなマクロファージの活性化の差異は内藤らのグループが 10 年を越える MDPCl₂ 封入リポゾーム投与によるマクロファージ枯渇実験で解明されたマクロファージの分化、成熟に関する諸事実によっても裏付けられ、Kupffer 細胞枯渇状態での単球の末梢血中からの動員と肝局所のマクロファージ前駆細胞の増殖によって回復することと一致する。これは筆者が繰り返し主張した組織マクロファージと単球系マクロファージとの発生、分化や成熟に関しての相違点とも符合する。すでに「マクロファージの系統発生」における「硬骨魚類」の項(p. 184)で紹介したように、金魚のマクロファージの発生、分化に関して Belosevic、Barreda ら(2001、2004~6)は単球系マクロファージ群を古典的分化経路(classical pathway of macrophage differentiation)、単球系細胞の分化段階を経由せず未熟なマクロファージ前駆細胞から分化するマクロファージ群を代替的分化経路(alternative pathway of macrophages)と呼んだ^{1035~1038}。同様の分化経路は「哺乳類のマクロファージの個体発生」(p. 235)でも明らかで、従って、両マクロファージ群は活性化の面からばかりではなく、分化経路からも、単球系細胞を経由する古典的分化マクロファージ(classically differentiated macrophages)、単球系細胞を経由しない代替的分化マクロファージ(alternatively differentiated macrophages)と命名すべきである。

以上詳述した如く、MDPCl₂ 封入リポゾーム投与実験や CD11b-DT 遺伝子導入マウスで Kupffer 細胞を除去すると、Moriyama ら(1997)のザイモサン投与による肝肉腫形成実験では、肝肉芽腫の形成が遅延し¹³⁴²、Duffield ら(2005)が行った CD11b-DT 遺伝子導入マウスを用いての研究では肝線維化や修復反応は抑制された¹³³²。このことは肝臓で生体防御上第一線にある Kupffer 細胞が欠如すると、局所での防御反応が惹起されず、投与後 1 日には M-CSF、IL-1、MCP-1、TNF- α 、INF- γ などの炎症性サイトカインの発現は抑制され、このため末梢血の単球の動員や肉芽腫形成への参画が阻止される。ザイモサンやザイモセルは β グルカンと同様に強力なマクロファージ刺激物質であるが、これらのマクロファージ刺激物質とは異なり、生菌が感染した場合、Kupffer 細胞が欠如した状態では、リステリア菌は肝細胞に直接感染し、感染した肝細胞はアポトーシスに陥ち、死滅し、そのため動物

は死亡する^{1343, 1621)}。

次いで、筆者らの行った ^{89}Sr 投与による極度単球減少症惹起マウスを用いて β -グルカン投与による肝肉芽腫形成実験によると^{468, 487, 488)}、上述した MDPCL_2 封入リポゾーム投与実験や CD11b-DT 遺伝子導入マウスでの **Kupffer** 細胞枯渇状態とは異なり、 ^{89}Sr 投与後 2 週目には末梢血中から単球はほぼ完全に消失するが、肝臓局所の **Kupffer** 細胞を含めて生体各所の組織マクロファージは正常マウスと同様に正常に存在する。末梢血から単球が消失した状態の ^{89}Sr 投与マウスに β -グルカンを投与すると、肝肉芽腫形成は遅延し、ザイモサン投与後 5 日までは肉芽腫の形成は起らない。これは末梢血中に単球が欠如し、単球が動員されず、このため肉芽腫形成は遅延する^{467, 468)}。このように、 β -グルカン投与後 5 日頃までの肝肉芽腫形成には単球が重要な役割を演じている。しかしながら、この頃から既存の **Kupffer** 細胞が増殖を開始し、肝類洞内で集簇し、肉芽腫を形成する。さらに、肉芽腫を構成するマクロファージは相互に癒合し、多核性巨細胞に変態する^{468, 488)}(「マクロファージの分化転換と細胞融合」の項(p.400)ならびに図 93A 参照)。このように、末梢血単球の欠如した状態では、肝臓局所の在住マクロファージ、すなわち **Kupffer** 細胞が増殖し、集簇し、肉芽腫を形成し、末梢血からの単球の動員と関与はなくとも **Kupffer** 細胞のみで肝肉芽腫が形成される。

すでに詳述したように、*op/op* マウスでは骨髄での単球系細胞の発達が障害され、末梢血中の単球は欠如あるいは極度に減少し、組織での単球からマクロファージへの分化は障害され、これらの異常は **M-CSF** の欠損に起因する。筆者らが行った *op/op* マウスに β -グルカンの投与による肝肉芽腫形成実験^{1630, 1631)}によると、 ^{89}Sr 投与惹起極度単球減少症マウスと同様に *op/op* マウスにおける肝肉芽腫の形成は 5 日までは起らず、この頃から未熟な **Kupffer** 細胞が増殖が開始され、増殖細胞の集簇によって肉芽腫が形成される。このように、*op/op* マウスでも既存の未熟 **Kupffer** 細胞が増殖し、**M-CSF** 以外のサイトカインの作用での肉芽腫マクロファージへと分化し、活性化され、肝肉芽腫が形成される。*Op/op* マウスでは ^{89}Sr 投与惹起極度単球減少症マウスと同様にグルカン肉芽腫の形成の早期には末梢血からの単球補給は起らず、肉芽腫形成は遅延し、肉芽腫マクロファージは単球由来のマクロファージとは異なった別の分化経路を介して単球系細胞以前の分化段階の未熟マクロファージに由来し、分化し、活性化される。

Op/op マウスに **M-CSF** を連日投与すると、既存の未熟 **Kupffer** 細胞は投与開始後 2 日をピークに増殖し、その後増殖率は減少し、2 週頃から正常同腹マウスとほぼ同じレベルが維持される。末梢血中の単球数も **M-CSF** の投与開始後 3 日をピークに増加し、その後漸次減少し、約 2 週後には正常同腹マウスのレベルが維持される。**M-CSF** 連日投与 *op/op* マウスにザイモサンを投与し、肝肉芽腫の形成を検討すると、筆者らは肝肉芽腫の形成は正常同腹マウスとほぼ同様であることを実証した^{1630, 1631)}。すなわち、肝臓における肉芽腫性炎症では、早期には回復した末梢血中からの単球の動員と侵入、さらにマクロファージへの分化ならびに活性化が主役を演じ、中期から後期にかけては未熟 **Kupffer** 細胞の成熟と増殖

が加わる。

すでに「MCP-1/CCR2 欠損マウス」の項(p. 314)で述べた如く、MCP-1 や CCR2 欠損マウスでは、ザイモセル投与で肝肉芽腫の形成は低下し、肝肉芽腫への単球の浸潤は起らず、滲出マクロファージを欠如する^{473, 477}。しかし、これらの欠損マウスでは、各所組織に無刺激時常在する組織マクロファージは野生型マウスと同様で、発生障害や数の減少はなく、肝臓ではザイモセル投与では **Kupffer** 細胞によって肉芽腫が形成され、その形成過程は基本的には ⁸⁹Sr 投与惹起極度単球減少症マウスと同様である^{467, 468, 473, 477, 488}。

筆者らは GM-CSF 欠損マウスにザイモサンを投与し、肝肉芽腫の検討を行った⁴⁸⁸。野生型マウスに比較して、GM-CSF 欠損マウスにおける肝肉芽腫形成は投与後 5 日までは遅延し、8 日でピークに達し、肉芽腫の数や大きさには差異がなくなるが、その後の数や大きさの減少は野生型マウスよりも早く、14 日には消退する^{488, 1296}。このように、GM-CSF 欠損マウスでは、肉芽腫形成が遅れ、早く消退する。しかし、RT-PCR による検索では、MCP-1、IL-1、TNF- α 、INF- γ などのサイトカインは野生型マウスとはメッセージレベルでの差異がなく、このことから肝肉芽腫形成早期の単球/マクロファージの病巣への流入低下や肝肉芽腫の早い消退は GM-CSF の完全欠損に起因する。この事実は「GM-CSF 欠損マウスと肺泡マクロファージの分化障害ならびに肺泡蛋白症の発症」の項(p. 276)で述べたように、肺泡蛋白症における肺泡マクロファージの動態はサーファクタントの蓄積にも拘わらず細胞数は野生型マウスとほぼ同じで、細胞数の増加と PU.1 の発現を起さず、マクロファージの発達状態は未熟で、アポトーシスが亢進し、細胞回転が速く、細胞が生存、維持されないこととほぼ一致する¹²⁹⁶。

筆者らは IL-5 遺伝子導入マウスや IL-5 投与マウスに β -グルカンを投与し、肝肉芽腫の形成を検討した¹⁶³²。これらマウスでは、肝肉芽腫の形成が亢進し、これは好酸球の著しい浸潤によるもので、IL-5 投与マウスでの肝肉芽腫内の好酸球の浸潤は抗マウス IL-5 モノクローナル抗体 NC17 の投与で完全に抑制された¹⁶³²。しかし、この過程でマクロファージの動態には直接的な影響は見られなかった。さらに、筆者らはヌード・マウス、SCID マウス、xid マウスの 3 種の免疫不全マウスにザイモサンを投与し、肝肉芽腫の形成を検討した^{1633, 1634}。その結果、ヌード・マウスや SCID マウスでは、肝肉芽腫の形成に遅延が見られた。末梢血ならびに肝肉芽腫内では Thy-1.2 陽性 T 細胞が減少し、これが肝肉芽腫内でのマクロファージの分化、成熟や活性化に障害を惹起し、肝肉芽腫の形成に遅延をもたらした^{1633, 1634}。Xid マウスは B 細胞の分化や増殖の障害を伴った伴性免疫不全症(X-linked immunodeficiency: xid)を発症するが、末梢血中の T 細胞数は正常である。Xid マウスにザイモサン投与すると、肝肉芽腫形成は早期では軽度亢進し、5 日にピークに達し、8 日以降肝肉芽腫は急速に低下し、消退する¹⁶³⁴。この過程で、xid マウスのザイモサン投与後早期の肝肉芽腫形成亢進は肉芽腫内への単球ないし単球以前の分化段階のマクロファージ前駆細胞の侵入、肉芽腫マクロファージの増殖、貪食能ならびに消化機能の亢進は対照マウスに比較して増加し、肝肉芽腫内における T 細胞の比率も対照マウスより高く、この T 細

胞の比率の増加は肉芽腫マクロファージの活性化と機能の亢進を惹起し、そのため肝肉芽腫内でのマクロファージによるザイモサンの貪食と消化が亢進し、分解、処理され、肝肉芽腫は急速に消失する^{1633, 1634})。以上述べた如く、3種類の免疫不全マウスを用いてのザイモサン投与による肝肉芽腫形成の解析から肉芽腫マクロファージの活性化にT細胞の関与が重要であることが明らかである。ヒトでのサルコイド症患者では、TNF- α やIFN- γ に反応して肉芽腫マクロファージにICAM-1の発現が亢進し、抗ICAM-1モノクローナル抗体を投与して置くと、マクロファージの接着や集簇形成は障害される¹⁶³⁵)。

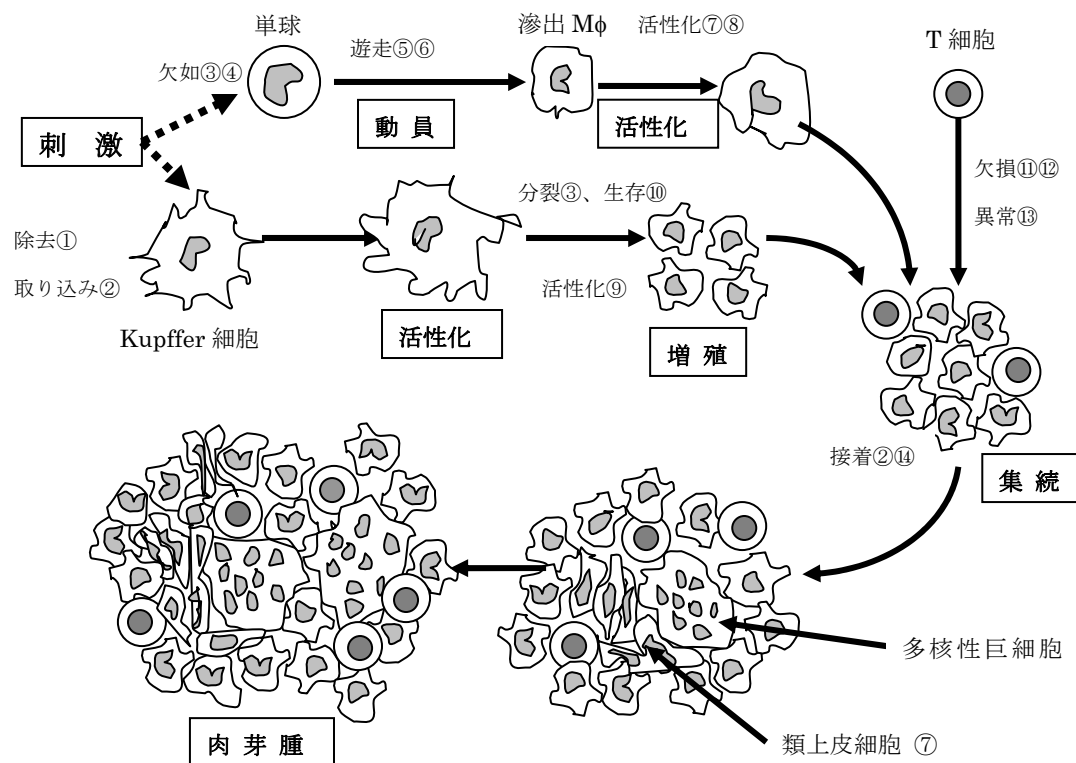
Kupffer細胞は肝在住の組織マクロファージで、SR-A-I、II(CD204)を保有し、酸化LDLなどの変性LDLを始め種々の老廃物、AGE、アポトーシス細胞、細菌あるいは異物など多様な巨大分子状物質を取り込み、処理に当たり、この過程は非免疫貪食(non-immune phagocytosis)あるいは非オプソニン貪食(non-opsonic phagocytosis or non-opsonophagocytosis)と呼ばれる(「スカベンジャー受容体欠損マウス」の項(p. 326)参照)。筆者らはSR-A-I、II欠損マウスに*C. parvum*死菌を静注し、肝肉芽腫を形成し、その発達状態を野生型マウスと比較した¹⁶³⁵)。その結果、MSR-A-I、II欠損マウスでは野生型マウスよりも肺肉芽腫の形成が遅延し、肝肉芽腫形成初期の末梢血単球の遊走と活性化マクロファージへの分化や細胞相互の接着や集合、肝肉芽腫内でのマクロファージの病原体の貪食、処理が障害され、肉芽腫の消退も遅延する¹⁶³⁶)。これは肺臓でのMCP-1、TNF- α 、IFN- γ などの炎症性サイトカインの産生障害によるもので、これは既存のKupffer細胞におけるSR-A-I、IIの欠損によって、これら炎症性サイトカインの産生に必要なシグナル伝達が作動しないことによる。しかし、SR-A-I、II欠損マウスで形成される*C. parvum*死菌惹起肝肉芽腫では、病変の中心には野生型マウスの肉芽腫よりも壊死が多発する。SR-A-I、II欠損マウスにザイモセルを静注し、発生させた肝肉芽腫内に集簇したマクロファージはルーズで、緻密な肉芽腫を形成せず、これらの知見はSR-A-I、IIの欠損による接着障害によるものである¹⁶³⁴)。以上の研究成績は*C. parvum*死菌やザイモセルを用いた研究で、既存のKupffer細胞にSR-A-I、IIが欠損すると、肉芽腫形成の低下や遅延が見られ、既存のKupffer細胞のMDPCI₂封入リポゾーム投与による欠如状態のみならずSR-A-I、IIの欠損によっても同様の結果が提示されている。

これに対して、SR-A-I、II欠損マウスに*L. monocytogenes*生菌を感染させると、野生型マウスやヘテロ接合体同腹正常マウスの生存率が80%程度であるのに対してSR-A-I、II欠損マウスの生存率は極度に低下し、感染後4日ですべて死亡する^{1343, 1621, 1637})。肝臓にリステリア菌が感染すると、リステリア菌はKupffer細胞に取り込まれ、野生型マウスではエンドソームからファゴゾームに移行する過程でリステリア菌が増殖し、ライソゾームと癒合し、ファゴライソゾーム内に移行し、処理される。しかし、SR-A-I、II欠損マウスではSR-A-I、IIの欠損あるためリステリア菌はC3Rのどのその他の受容体に結合し、Kupffer細胞に取り込まれるが、エンドゾーム、ファゴゾーム、ライソゾームに移行する段階で、MSR-A-I、IIを介しての酸性化機構が障害され、リステリオリジンO (listeriolysin O: LLO)

産生リステリア菌はファゴゾーム内で殺菌されず、増殖、集積する^{1343, 1621, 1637}。上述したザイモセルや *C. parvum* 死菌などの投与による肝肉芽腫形成実験成績では、SR-A-I、II 欠損マウスは野生型マウスに比べて、肝肉芽腫の形成が低下するのに対して、野生型マウスに比べて、リステリア菌の感染では肝肉芽腫の形成は感染後 5 日をピークに約 3 倍の亢進を起し、肝臓内での菌数は有意に増加する。SR-A-I、II 欠損マウスの肉芽腫マクロファージでは、抗マウス SR-A モノクローナル抗体 2F8 投与マウスの肉芽腫マクロファージと同様に野生型マウスの肉芽腫マクロファージに比較して、リステリア菌の貪食は低下し、SR-A-I、II がリステリア菌の取り込みに受容体として作動する。LLO を産生しない同種変異リステリア菌の殺菌作用は SR-A-I、II 欠損マウスでも野生型マウスのマクロファージと同様である。しかし、野生型マウスのマクロファージでは、リステリア菌の殆どはライソゾーム内で分解、殺菌、除去される。これに対して、SR-A-I、II 欠損マクロファージでは LLO 産生リステリア菌は殺菌機構の障害によって集積、増殖するが、ファゴゾーム・ライソゾーム癒合以前のファゴゾーム内でリステリア菌は LLO を分泌し、ファゴゾーム膜を融解し、サイトゾールへと脱出する。このため、SR-A-I、II 欠損マウスでは肉芽腫マクロファージが野生型マウスよりも多数集積し、肝肉芽腫の数や大きさは増大する^{1621, 1637}。弱毒ウシ型結核生菌 BCG 感染は野生型マウスの生存率は 100%で、マウスは死亡しない。しかし、BCG 生菌感染が SR-A-I、II 欠損マウスに起ると、生存率は低下し、感染後 60 日では約 40%にまでになる。肺臓や肝臓における BCG 感染を検討すると、28 日の実験期間すべてで野生型マウスに比べて、SR-A-I、II 欠損マウスでの細菌数は増大し、とりわけ肝臓での差異が顕著である¹³⁴³。これらの知見は SR-A-I、II がリステリア感染のみならず BCG 菌感染における生体防御上重要であることを物語っている。

BCG 感染マウスの肝肉芽腫は局所 TNF 産生部位に一致して形成され、TNF は肝肉芽腫を形成するマクロファージから産生される。BCG 感染マウスにウサギ抗 TNF- α 抗体を投与すると、BCG 誘発肝肉芽腫の形成は劇的に抑制され、類上皮細胞の発達を欠き、牛型結核菌の排除も阻害される¹⁵⁴¹。3 週後に抗 TNF 抗体を投与すると、一旦十分発達した肝肉芽腫は急激に消退する¹⁵⁴¹。TNF- α 受容体 I (TNF-R1)欠損マウスや可溶性 TNF-R1 投与マウスでは、*C. parvum* 熱処理死菌あるいは BCG 生菌の感染による肝肉芽腫の形成は極度に抑制され、*C. parvum* の投与後 10~13 日頃形成された肉芽腫は可溶性 TNF-R1 の投与によって消退する¹⁵⁴¹。この研究成果は TNF-R1 を介する TNF シグナル伝達が *C. parvum* ないし BCG 惹起肝肉芽腫発生機構に関連し、可溶性 TNF-R1 は肉芽腫形成を抑制し、肉芽腫の消退に関与することを物語る。INF- γ もマクロファージの活性化に作用し、MHC クラス II 分子の発現を誘導する。INF- γ 欠損マウスでは、マクロファージの補給は障害されないが、マクロファージの活性化は抑制され、ヘルパー T 細胞の活性化を介しての炎症は低下し、これらの機序による肉芽腫形成に低下を惹起する¹⁶⁴²。INF- γ を封入したリポゾームを経気道的に噴霧すると、肺胞マクロファージは有意に活性化される¹⁶⁴³。このように、INF- γ はマクロファージの活性化を促す。

図 82 遺伝子改変マウスを主とする実験的マウスモデルの解析に基づく肝肉芽腫形成過程での Kupffer 細胞ならびに単球の関与に関する模式図



①Cl₂MP 投与マウス、②MSRA-1、2 欠損マウス、③⁸⁹Sr 惹起極度単球減少マウス、④*op/op* マウス、⑤MCP-1 欠損マウス、⑥CCR2 欠損マウス、⑦ TNF- α 欠損マウス、⑧IFN- γ 欠損マウス、⑨IFN- γ 封入リポゾーム投与マウス、⑩GM-CSF 欠損マウス、⑪ヌードマウス、⑫SCID マウス、⑬xid マウス、⑭抗 ICAM-1 モノクローナル抗体投与(ヒトのサルコイド症患者肺胞 M ϕ 培養) M ϕ : マクロファージ

図 82 は以上述べた肝肉芽腫の主要構成細胞である肉芽腫マクロファージに関して既存の Kupffer 細胞除去マウス、⁸⁹Sr 投与単球極度減少症惹起マウス、*op/op* マウス、SR-A- I、II 欠損マウス、IL-5 遺伝子導入マウス、ヌード・マウス、SCID マウス、xid マウスなどの遺伝子異常ないし遺伝子改変マウスを用いて、マクロファージとその亜群の役割を模式図に要約したものである。肝肉芽腫を構成するマクロファージは既存の Kupffer 細胞ならびに血液単球の関与によって形成される。Duffield ら(2005)は、肝線維化の解析によって前者を代替的活性化マクロファージ、後者を古典的活性化マクロファージと命名し、識別し、肝肉芽腫を含む炎症状態とその修復でのマクロファージの活性化機構に関して異なる 2 型の活性化マクロファージの存在を主張した¹³³²⁾。これら 2 型の活性化マクロファージは筆者らが繰り返し主張したように、個体発生を含めて起源を異にする原始造血や決定造血に辿ることが出来、生後の骨髓造血でも分化過程を異にする組織マクロファージや単球系マク

ロファージとから連続し、炎症状態での活性化過程を異にする細胞群ばかりでなく、模式図に示した如く、マクロファージの前駆細胞ならびに分化過程を異にする細胞群の存在が明らかである。

6) マクロファージ類縁細胞の分化と成熟

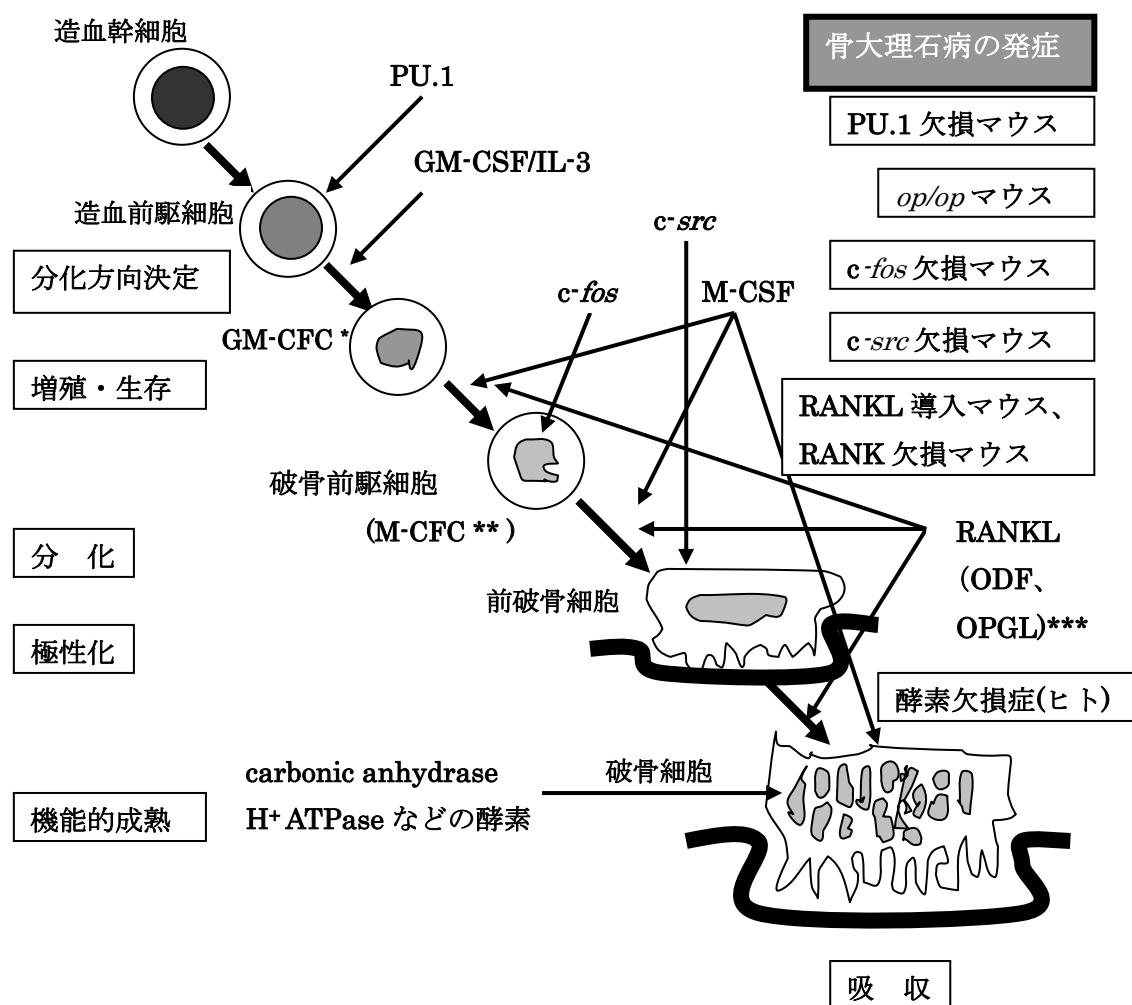
以上述べたように、組織マクロファージと単球由来の炎症性マクロファージとに関して前駆細胞、分化過程ならびに活性化について詳細に検討したが、以下マクロファージの類縁細胞である破骨細胞とミクログリアの発生、分化と成熟について詳細に検討する。

a) 破骨細胞の分化と成熟

図 83 は破骨細胞の発生、分化と成熟過程における遺伝子発現との関連を遺伝子あるいは諸増殖因子の欠損マウスの知見に基づいて提示した模式図である。造血幹細胞から破骨細胞への分化、成熟の過程で、それぞれの分化、成熟段階に関与する遺伝子や諸因子が欠如し、骨吸収が障害されると、骨大理石病が発症する。すでに述べた如く、*op/op* マウスでは、M-CSF の産生が先天的に障害され、破骨細胞の欠如し、骨吸収が障害され、そのため骨大理石病が発症する^{517~520}。*M-CSFR* マウスや抗 M-CSF 抗体連日投与マウスでも骨大理石病が発症し、前者は M-CSF 受容体の欠損によって M-CSF が利用されず⁵²¹、後者は抗 M-CSF 抗体の投与によって M-CSF 活性が低下、消失することが原因である¹²⁸⁴。*Op/op* マウスに M-CSF を連続投与すると、破骨細胞が発生、分化し、数を増し、骨大理石病は改善され、破骨細胞の分化には M-CSF が重要であることが実証されている⁵¹⁹。しかしながら、*op/op* マウスが老齢化すると、M-CSF の欠如にも拘わらず、単核性 TRAP 陽性破骨前駆細胞、すなわち前破骨細胞が発生し、これは老化 *op/op* マウスでの GM-CSF/IL-3 の産生亢進に起因する^{520, 1274, 1275}。若年性 *op/op* マウスに GM-CSF あるいは IL-3 を連続投与すると、前破骨細胞が発生し、増加する⁵²⁰。この事実から、破骨細胞は単球系細胞以前の分化段階の GM-CFC から M-CFC に分化する過程で、単球を経由せず、前破骨細胞が派生し、破骨細胞に分化する径路を辿ることが判る^{519, 520}。

PU.1 は造血幹細胞から造血前駆細胞へ分化し、骨髓系細胞や B リンパ球系細胞への分化を決定する転写因子で、PU.1 欠損マウスは造血前駆細胞の骨髓系細胞への分化がブロックされ、破骨細胞が発達せず、そのため骨吸収が障害され、骨大理石病を発症する⁵²⁷。*C-fos* は Jun 遺伝子とロイシン・ジッパーを介して安定したヘテロダイマー AP-1 (activator protein-1) を形成し、この転写因子は造血幹細胞が破骨細胞に分化する過程で、M-CFC に作用し、破骨細胞への分化と増殖とに関連する。*C-fos* 欠損マウスはこの過程が障害され、破骨細胞が欠損し、骨大理石病が発症するが、マクロファージの分化は障害されない^{1640, 1641}。*C-src* 遺伝子産物は受容体型チロジナーゼで、C 末端のチロジン残基のリン酸化を介して酵素活性を負に制御し、破骨細胞の波状縁や小胞内に局在する。*C-src* 欠損マウスでは、破骨細胞は発生するが、骨吸収に不可欠な波状縁は形成されず、骨吸収が障害され、

図 83 破骨細胞の発生、分化と成熟における遺伝子発現と諸因子の関与



* GM-CFC: granulocyte-macrophage colonyforming cells、** M-CFC: macrophage colony formig cells、

*** ODF: osteoclast differentiation factor、RANKL: receptor activator of NFκB ligand、OPGL: osteoprotegerin ligand

骨大理石病を発症する¹⁶⁴²⁾。

破骨細胞分化因子 (osteoclast differentiation factor:ODF)は TNF スーパーファミリーに属する II 型膜結合蛋白質で、C 末端側を細胞外に出し、成熟破骨細胞を活性化し、M-CSF の存在下で破骨細胞の形成を促し、OPGL (osteoprotegerin ligand)、TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine)、RANKL (receptor activator of NFκB ligand)と呼ばれた分子と同一で、今日では RANKL の名称で統一されている^{1642~1646)}。RANKL 遺伝子導入マウスでは、OPG が過剰に発現し、破骨細胞は形成されず、骨大理石病を発症する¹⁶⁴⁷⁾。RANKL 欠損マウスでは、破骨細胞が増加し、骨疎鬆病を発症するに對して¹⁶⁴⁸⁾、NF-κB 欠損マウスでは、逆に破骨細胞の発達は欠如し、骨大理石病を発症する^{1648, 1649)}。破骨細胞

は骨吸収を行う上に H^+ ATPase や II 型炭酸脱水素酵素(carbonic anhydrase II)、カテプシン K、ビタミン D、副甲状腺ホルモンなどが関与し¹⁶⁵⁰⁾、ヒトでは骨吸収に不可欠のプロトンポンプに関与する H^+ ATPase や II 型炭酸脱水素酵素の酵素欠損症が知られ、これらの酵素が欠如すると、機能的に骨吸収が障害され、骨大理石病を発症する^{1651, 1652)}。

以上述べたように、破骨細胞は骨髄に起源する造血幹細胞の分化、成熟によって形成され、造血前駆細胞が増殖し¹⁶⁵³⁾、GM-CFC から M-CFC への分化過程で、破骨前駆細胞を経由して前破骨細胞への分化し^{519, 520, 1647, 1654)}、前破骨細胞に極性化が起り、刷子縁や骨吸収に特異な小胞系発達し、多核化に伴い細胞は大型化し、破骨細胞へと分化、成熟する。この過程で筆者らは van Furth らの主張する如く、果たして破骨細胞が単球に由来するかどうかを *op/op* マウスを用いて詳細に検討した。その結果、破骨細胞の前駆細胞である前破骨細胞は GM-CFC から M-CFC に分化する過程で、GM-CFC から単球系細胞の分化段階を経由することなく、GM-CSF/IL-3 の作用で前破骨細胞に分化し、さらに M-CSF によって多核化し、破骨細胞に成熟する。TNF- α は *c-fms* 発現の上方調節によって骨髄内での破骨前駆細胞の増殖と分化を促進し、末梢血中での循環する破骨前駆細胞の数を増加させる¹⁶⁴²⁾。この骨髄前駆細胞から GM-CFC を経由して M-CFC に分化する過程で、前破骨細胞は *c-fms* を発現し、マクロファージとしての性格を獲得するが、しかし、単球系細胞の分化段階を経由せずに破骨細胞へと分化、成熟する。この過程は老化 *op/op* マウス^{1274, 1275, 1277)}や GM-CSF/IL-3 連続投与若年 *op/op* マウスでも観察される⁵²⁰⁾。*Op/op* マウスでは M-CSF 欠損のため単球系細胞の発達や分化障害があり、末梢血中には単球が極度に減少し、あるいは欠如しているにも拘わらず、未熟なマクロファージが発達し、この細胞は GM-CSF/IL-3 の作用によって単球系細胞とは別の分化経路を経由して分化し、組織マクロファージに分化、成熟し、破骨細胞も同様の径路を辿る。

すでに「マクロファージとその亜群、ならびに近縁細胞」の「破骨細胞」の項(p. 246)で述べた如く、前破骨細胞 (preosteoclasts)は TRAP 陽性の単核性細胞で、破骨細胞は前破骨細胞の癒合によって多核性となり、TRAP は強陽性である。図 83 に示した如く、前破骨細胞は破骨前駆細胞 (osteoclast precursors)に由来するが、培養上の同定では、破骨前駆細胞は CFU-O (osteoclast colony-forming unit)と定義され、M-CSF に反応するマクロファージ前駆細胞、すなわち M-CFC よりも未熟で、幹細胞因子 (SCF: stem cell factor)に反応する多分化細胞系前駆細胞 (multilineage hematopoietic progenitors)よりは成熟した分化段階の細胞と見做される¹⁶⁴⁶⁾。破骨前駆細胞は Takeshita ら(2000)によってプロ破骨細胞 (pro-osteoclasts)と命名され、培養上 TRAP 陰性、オステオポンチン、CD14、F4/80 陽性の紡錘形マクロファージと規定された¹⁶⁵⁴⁾。しかし、破骨前駆細胞には、円形、類円形の細胞も含まれ、単一の細胞群とは見做し難く、骨髄系前駆細胞(myeloid progenitor cells)のみならず、「リンパ系前駆細胞を経由するマクロファージの分化転換」の項(p. 264)で後述する如く、リンパ系前駆細胞(lymphoid progenitor cells)由来のプロ B 細胞 (proB cells)を経由して発生するものも包括され^{1655~1657)}、破骨細胞の発生には骨髄系と B 細胞系を経由する

二方向性の造血前駆細胞の存在が主張されている^{1655, 1656}。

破骨前駆細胞の同定には CD11b がマーカーとして使用される^{1656, 1657}が、これにマクロファージや単球のマーカーである *c-fms*、CD14 や F4/80 の陽性像が加えられることがあり^{1658~1660}、破骨細胞の同定上見解の統一を欠く。これは生体内の状況に左右され、例えば、ヒトや動物での関節炎で発現する TNF- α は *c-fms* の発現を亢進し、骨髓内での破骨前駆細胞の増殖や分化を促し、末梢血中には循環中の破骨前駆細胞の数が増加し、マクロファージの免疫表現型を表出する^{1658, 1661}。破骨前駆細胞は増殖能を有し、骨髓前駆細胞に由来する場合、GM-CFC に相当し、GM-CSF、IL-3、M-CSF の作用に反応し、増殖し、ことに M-CSF はアポトーシスを抑制する^{1661, 1662}。この細胞は、培養実験によって GM-CFC から M-CFC へ分化する段階の細胞に相当することが実証され^{1661, 1662}、生体内では *op/op* マウスの老化に際して GM-CFC から前破骨細胞の前段階の細胞が出現し、*op/op* マウスで欠如している M-CSF の代用として GM-CSF、IL-3、VEGF が作用し、破骨前駆細胞の分化を促すことが明らかにさえている^{1274, 1275, 1280, 1663}。単核性の前破骨細胞は RANKL あるいは 1,25-(OH)₂ ビタミン D₃ の作用によって癒合し、多細胞化し、破骨細胞に分化し、RANKL や IL-1 によって破骨細胞は活性化され、機能的に成熟する^{1662~1668}。機能的に成熟した破骨細胞は骨髓内で約 2 週間生存し¹⁶⁶¹、やがてアポトーシスに堕ち、死滅する¹⁶⁶⁹。破骨細胞のアポトーシスを起す因子には bisphosphonates や TGF- β など^{1669, 1670}の他に、性ホルモン、副腎皮質ホルモン、副甲状腺ホルモンなど種々の物質の関与が知られている¹⁶⁷¹。培養上 M-CSF が回収されたり、あるいは消費されると、破骨細胞はアポトーシスに陥り、死滅するが、筆者は *op/op* マウスの研究で、M-CSF の連日投与によって正常マウスを越えるレベルにまでに破骨細胞の数が回復した時点で M-CSF の投与を中断すると、生体内で破骨細胞はアポトーシスを起し、減少、消失することを確認している。

以上述べた破骨細胞の発生、分化ならびに成熟過程を要約すると、骨髓内で発生した造血幹細胞は造血前駆細胞から破骨前駆細胞の分化段階を経由して前破骨細胞に分化し、極性化し、刷子縁を形成する。前破骨細胞は癒合し、多核化する(「マクロファージの分化転換と細胞融合」の項(p. 400)参照)。刷子縁が発達し、破骨細胞に分化、成熟し、これらの一連の破骨細胞の分化、成熟過程では、単球から派生するのではなく、破骨細胞は造血前駆細胞の分化段階から単球系細胞/マクロファージ系、樹状細胞系と別々の径路を辿り、組織マクロファージの分化、成熟の過程に類似する。

b) ミクログリアの発生、分化と成熟

約 90 年以前 Hortega (1919, 1932) は中枢神経系で最初 Cajal (1913) の指摘した神経細胞と神経膠細胞とに次いで第 3 の細胞群として 2 種類の細胞型、乏突起膠細胞(oligodendroglia)と小膠細胞(ミクログリア: microglia)とを塩化銀鍍銀染色によって同定し、前者を外胚葉由来、後者を中胚葉由来と見做した^{1212, 1213}。さらに、Hortega はミクログリアが胎生早期に軟脳膜に起源し、胎生の進行とともに脳実質内に侵入、分布し、分枝状の静

止型ミクログリアに分化、成熟することを主張した^{1212, 1213}。しかしながら、その後ミクログリアは胎生期ばかりではなく、成熟個体の中枢神経系でも無刺激定常状態のみならず種々の病的状態でも出現し、形態学的にも多様であることが明らかにされ、その起源を巡っても軟脳膜や血管周囲の間葉細胞、単球、血管周皮細胞、グリア細胞、神経細胞など種々の細胞起源が主張され、熾烈な論争が繰り返された^{1217, 1220}。それらは Kaur ら(2001)¹²²⁰、Rezaie & Male (2002)¹⁶⁷²、Cuadros & Navascués (1998)¹⁶⁷³によって纏められ、要約すると、①中胚葉由来、②神経外胚葉由来、③単球由来説の3つの主だった学説に区別される。

最初 Hortega (1919, 1823)によって主張された①の中胚葉起源説では、アメーバ状ミクログリアの胎生期での中胚葉起源と成熟脳における静止型ミクログリアへの分化、成熟し、胎生期の軟脳膜はミクログリアの源泉(fountains of microglia)と見做された。この学説はその後 Penfield (1932)¹⁶⁷⁴によって受け継がれ、Kershman (1939)¹⁶⁷⁵はアメーバ状ミクログリアが最も幼若で、可動性、ヒト胎児脳での軟脳膜や血管との関連性を指摘した。Dougherty (1944)¹⁶⁷⁶、Cammermeyer (1970)¹⁸⁵はミクログリアと軟脳膜の間葉細胞との形態学的類似性、Boya ら(1973)¹⁶⁷⁷は酸ホスファターゼを用いての組織細胞化学、Boya ら(1987, 1991)^{1678, 1679}、Ashwell (1991)¹⁶⁸⁰、Kaur ら(1991)¹⁶⁸¹はレクチンを用いた免疫組織学的検索成績を報告し、さらに電顕的研究成績^{1216, 1217}も加味され、ミクログリアの起源を胎生期の卵黄嚢や軟脳膜の間葉細胞に求める考えは近年でも Dalmau ら (1997)¹⁶⁸²、Alliot ら (1999)¹²²³多くの研究者によって支持されている。

これに対して、②ミクログリアの神経外胚葉起源説は Rydberg (1932)¹⁶⁸³を始め多くの研究者によって主張され、この辺の事情は Kaur ら(2001)の総説によって詳しく述べられている¹²²⁰。本邦でも神経外胚葉起源説は Matsuyama ら(1973)¹⁶⁸⁴、Fujita & Kitamura (1975)¹⁶⁸⁵、Fujita ら(1981)¹⁶⁸⁶、Kitamura ら(1984)¹⁶⁸⁷によって電顕的検討に加えて、H³-サイミジン・オートラジオグラフィーで増殖細胞が解析され、とりわけ上衣下細胞は神経膠芽細胞 (glioblasts)であって、増殖能を保有し、神経外胚葉に起源し、この細胞がミクログリアの前駆細胞と主張された。1990年以降でもこの考えは種々のモノクローナル抗体を用いての研究で主張され、Dicken & Mattiace (1989)¹⁶⁸⁸は星状細胞とミクログリアとがBリンパ球に特異的なモノクローナル抗体 LN-1 を認識するエピトープを有することから、Hutchins ら(1990)¹⁶⁸⁹はレクチン(RCA-1)による組織細胞化学的証明と組織マクロファージならびにミクログリアとともに認識するモノクローナル抗体を用いた研究成果から、個体発生上胚基質層 (germinal matrix layer)にミクログリア前駆細胞の起源を求めた。McKanna (1993)^{1690, 1691}、Federoff ら(1997)¹⁶⁹²は神経外胚葉細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体、リポコルチン 1(lipocortin-1)によって胎生期の脳でのミクログリアが標識され、その他のモノクローナル抗体でもミクログリアと星状細胞とがともに陽性であることを根拠にして、Wolzwijk (1995)¹⁶⁹³もラットのミクログリアを認識するモノクローナル抗体 ED1(CD68)、OX-42、GSA I-B4 が乏突起膠細胞をも認識することから、ミクログリアの神経外胚葉起源を主張した。

③のミクログリアの単球由来説の提唱も古く、最初 Santha & Juba (1933)¹⁶⁹⁴、Juba (1934)¹⁶⁹⁵によってヒトのミクログリアの単球由来が提示されたが、その後この考えは1970年代に至るまで確定的ではなかった。「MPS 学説の概念と提唱」の項で述べた如く、van Furth ら(1970、1972)によってミクログリアは生体各所のマクロファージと同様に MPS に包括され^{4, 5}、その実験的根拠として Inamoto & Loblond (1978)¹⁶⁹⁶、Ling & Tan (1974)¹⁶⁹⁷、Ling (1979)¹⁶⁹⁸、Ling ら(1980、1982)^{1699, 1700}、Kaur ら(1984、1987)^{1695, 1696}、Perry ら(1985)¹⁷⁰³による研究に準拠し、カーボン粒子を用いての単球の標識、電顕、非特異的エステラーゼ、酸ホスファターゼ、5'-ヌクレオチダーゼ、サイアミン・パイロホスファターゼなどの酵素組織細胞化学、F4/80 を始め種々のマクロファージ・モノクロナール抗体を用いての免疫組織化学など種々の方法が用いられ、今日に至るまで幾多の研究が報告されている^{1700~1703}。

すでに「中枢神経系のマクロファージ(ミクログリア)とその亜群」の項(p. 247)で述べた如く、中枢神経系では在住マクロファージとして、① 脳実質内に常在する静止型ミクログリア(**resting microglia**)、② 脳室内マクロファージ、③ 髄膜マクロファージ、④ 脳血管周囲マクロファージ、⑤ 脈絡膜マクロファージなどが区別され、これらのミクログリアとマクロファージとは無刺激定常状態で出現する¹⁷⁰⁴。このうち、ミクログリアは脳在住マクロファージの最大の細胞群で、細長い突起を伸ばした特異なマクロファージ系細胞である。ミクログリアは胎生初期から脳原基内に発生し、成熟個体では終生生存し、発生時期や脳内の内部環境によって① アメーバ状ミクログリア (**ameboid microglia**)、② 静止型ミクログリア、③ 反応性ミクログリア (**reactive microglia**)、④ 活性化ミクログリア(**activated microglia**)の4つの亜型に区別される。アメーバ状ミクログリアは胎生早期から脳原基内に出現し、卵黄嚢造血に起源する原始・胎生マクロファージの亜型である。この種のミクログリアの前駆細胞はマウスの胎生期のみならず成熟脳でも増殖能を有し¹⁷⁰⁵、この増殖能は胎生早期ほど高く、ラット胎仔脳では H³-サイミジン標識率は 23.2%に達する¹²¹⁷。静止型ミクログリアは無刺激定常状態の脳内に存在し、ヒトやマウスでは CD11b、CD11c、CD36、CD45、CD64、CD68、CD204、MARCO、Fc 受容体、C₃ 受容体を保有し、免疫貪食を営み、脳以外の生体各所で生理的に常在する組織マクロファージと同一範疇に属する^{1704, 1706}。しかし、発生過程や成熟脳ではミクログリアはこれら分化抗原の発現は低下し、単球/マクロファージのマーカーは表出されず、CD68 や CD204 などを発現する¹⁷⁰⁶。静止型ミクログリアは安定な細胞群で¹²²¹、増殖能は低く、長期生存し、細胞周期も緩やかである¹²²²。無刺激定常状態の脳ばかりではなく、炎症状態の脳でもミクログリアは安定した細胞群を形成する¹⁷⁰⁷。反応性ミクログリアは脳内での炎症や感染症などの刺激状態に出現し、刺激によって末梢血中から脳内に浸潤した単球から派生する滲出マクロファージと同一細胞群の属し、この細胞は MPS の一員と見做される。活性化ミクログリアは静止型ミクログリアや反応性ミクログリアが刺激によって活性化された細胞である。培養上活性化されたミクログリアは樹状細胞突起を伸ばし、単球系細胞のマーカーである非特異的エステラーゼ、

ミエロペルオキシダーゼ、CD14、RFD7は陰性であるが、ヒト白血球抗原 (HLA-DR)、樹状細胞マーカーRFR1を発現し、マクロファージと樹状細胞とに共通した表現型を示す¹⁷⁰⁶⁾。しかし、静止型ミクログリアにはCD205 (DEC-205/NLDC-145)やMIDC-8などの樹状細胞のマーカーは発現しない¹⁷⁰⁷⁾。

無刺激定常状態の中樞神経系には静止型ミクログリアが広く分布し、生体各所の臓器、組織に常在する組織マクロファージと原則的に同一の細胞群に包括されるが、刺激によって脳内の炎症、感染症や損傷に出現する単球由来の反応性ミクログリアとは異なる¹⁷⁰⁸⁾。同様な意味で、活性化ミクログリアもまた静止型ミクログリアとは区別される。しかし、通常胎生期では無刺激状態にあり、脳原基の発育に伴い出現するアメーバ状ミクログリアと無刺激定常状態における成熟個体の脳に発達する静止型ミクログリアとの関連を検討する必要がある。以下静止型ミクログリアの発生、分化過程に関しての実験的解析結果を述べ、次いで胎生期のアメーバ状ミクログリアとの関連性に関しては、筆者らの研究成果を中心に述べる。

生体内での組織マクロファージと末梢血単球との関連について筆者らが行った研究成果を要約すると、1) ⁸⁹Sr 投与による極度単球減少症惹起マウスでは、末梢血中単球の欠如にも拘わらず中樞神経系でのミクログリアは生体各所の組織マクロファージと同様に減少はなく、単球の末梢血からの補給がなくともミクログリアは正常に発達する。2) M-CSFの欠損があり、単球のマクロファージへの分化が障害されている *op/op* マウスでは、脳の海馬回での静止型ミクログリアの発達は正常である¹⁷⁰⁹⁾。この事実は海馬回における静止型ミクログリアはM-CSF非依存性で、GM-CSFやIL-3などのM-CSF以外の造血因子によって単球系細胞以前の分化段階から分化すること示している。しかし、筆者らの行った海馬回以外の部位での大脳皮質では、部位によってミクログリアの数は著しく減少し、このことはWitmerk-Packら(1993)の研究でも同様で¹⁷¹⁰⁾、筆者の研究でもM-CSFの連続投与によってミクログリアは増殖せず⁵¹⁹⁾、*op/op* マウスのミクログリアの増殖能の低下や活性化障害が脳損傷病変での解析でも報告されている^{1711~1713)}。しかしながら、GM-CSFやIL-3の連日投与によって *op/op* マウスの脳内に増加するミクログリアの細胞形態は円形ないし類円形で、細胞突起には乏しく、未熟で⁵²⁰⁾、この細胞はミクログリア前駆細胞の範疇に属する。以上の諸事実から、静止型ミクログリアはM-CSF非依存性で、単球に由来するM-CSF依存性の反応性ミクログリアとは異なり、GM-CSFやIL-3によってミクログリア前駆細胞が出現し、単球系細胞以前の分化段階を経由することなく造血幹細胞あるいは造血前駆細胞から直接由来する。

澤田や今井ら(1997~1999)はラット脳の混合培養で単離し、脂溶性蛍光色素PKH-26で標識した新鮮なミクログリア、*lacZ* 遺伝子をトランスフェクトし、β-ガラクトシダーゼを発現させた不死化ミクログリア、あるいはホルボールエステルで活性化させたマクロファージを動脈内に注射すると、新鮮なミクログリアは末梢血から脳実質内に移住する。β-ガラクトシダーゼ発現不死化ミクログリアの脳内移住も顕著であるが、他方マクロファージの

正常無処置脳内への移住は起らない^{1714~1716)}。しかし、筋組織移植ラット脳では、ミクログリアやマクロファージの浸潤が実証され、ミクログリアはマクロファージの浸潤を上回り¹⁷¹⁵⁾、アレチネズミでの脳虚血実験でも虚血脳病変へのミクログリアの浸潤が見られる¹⁷¹⁷⁾。このように、外来性に投与されたミクログリアは正常の脳でも血液脳関門(blood-brain barrier)を越えて脳内に移住するが、マクロファージは正常脳には移住せず、これは単球でも同様で、脳内に刺激の発現がない場合、単球の脳内移住は起らない¹⁷¹⁵⁾。しかしながら、脳内に刺激が惹起されると、MCP-1を始め種々の単球遊走因子が脳局所で産生され、血液単球が刺激され、CCR2などを介して血液脳関門を越えて脳内に浸潤し、単球由来の反応性ミクログリアに分化する¹⁷¹⁷⁾。この過程はMCP-1遺伝子導入マウスの脳でも実証され、虚血性脳障害を起すと、星状膠細胞からMCP-1が過剰に産生され、単球の障害病変への浸潤が起り、反応性ミクログリアに分化する¹⁷¹⁷⁾。反応性ミクログリアは活性化されると、主要組織適合遺伝子複合体クラスII抗原(MHC-II)やCD11cを発現し、抗原提示細胞としての性格を示すようになる^{1710, 1712)}。

これに対して、静止型ミクログリアにはMHC-IIやCD11cの発現は低く、抗原提示細胞としての性格に乏しく¹⁷⁰⁶⁾、CD205やMIDC-8などの樹状細胞マーカーは発現しない¹⁷⁰⁷⁾。造血幹細胞は血液脳関門を越えて末梢血中から脳実質内に移住し、静止型ミクログリアへと分化する¹⁷¹⁸⁾。致死的放射線照射を施したマウスに緑色蛍光蛋白(green fluorescent protein: GFP)遺伝子導入マウスの造血幹細胞を移植すると、ドナー由来の細胞は嗅球から延髄にかけての脳各所の実質内に血液脳関門を越えて移住し、造血幹細胞あるいは造血前駆細胞は脳実質内で分化し、顕著な細長い細胞突起を伸ばし、ミクログリアに特異的なマーカー*iba1*を発現し、静止型ミクログリアに成熟する¹⁷¹⁹⁾。移植4ヵ月後では、レシピエントの脳局所に移住したドナー由来のミクログリアは26%に達する¹⁷¹⁹⁾。この過程で、GFP発現造血幹細胞は移植後2週目では、血管周囲や軟髄膜に侵入し、4週頃から脳実質内に移住、F4/80や*iba1*などのマクロファージ・マーカーを発現、多数の細胞突起を伸ばし、静止型ミクログリアに分化する¹⁷¹⁹⁾。しかし、MHC-I、IIやCD45は陰性である。しかしながら、マウスの脳に動脈閉塞による虚血、切断損傷、顔面神経軸索切断など病変を起させると、24時間後には多数のGFP発現円形細胞が浸潤し、2週後には*iba1*陽性ミクログリアに分化し、その多くはMHC-IIを発現するが¹⁷²⁰⁾、4週後脳病変内には、ドナー由来のミクログリアは検出されなくなる¹⁷²⁰⁾。以上の事実から造血幹細胞や造血前駆細胞が中枢神経系に侵入し、脳実質内に分布し、静止型ミクログリアに分化することが実証されている。他方虚血性脳病変ないし創傷内には円形細胞が浸潤し、この細胞は単球と見做され、反応性ミクログリアに分化し、活性化され、4週後には死滅し、ドナー由来の反応性ミクログリアは病変ないし創傷部位では消失する。このように、ドナー由来の単球から分化した反応性ミクログリアは短命である。

同様の結果はラットの自己免疫脳炎や顔面神経軸索切断におけるGFP遺伝子導入造血前駆細胞を移植したX線照射キメラでも証明され、造血前駆細胞は脳実質内に単球/マクロフ

アージに分化し、血管周囲に分布し、反応性ミクログリアに変態する¹⁷¹⁷⁾。ヒト臍帯血あるいは末梢血から単離したヒト CD34 陽性造血前駆細胞にヒトの伴性副腎大脳白質変性症 (X-linked adrenoleukodystrophy: X-ALD) 蛋白や GFP のレンチウイルス発現ベクターを組み込んだ細胞を放射線照射 NOD/SCID マウス (non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mouse) に移植し、CD45(CLA) をマーカーにして追跡した結果、ヒト CD34 陽性造血前駆細胞は脳内に移住し、最初血管周囲に局在し、マクロファージ特異抗原 *iba1* を発現し、脳実質内に分布し、反応性ミクログリアに分化、成熟し、GFP や X-ALD 蛋白の発現を示した^{1721, 1722)}。のように、マウスモデルを用いて遺伝子操作を施した造血幹細胞の移植によって遺伝性ムコ多糖症、遺伝性ムコリピドーシス、異染性脳白質変性症などの遺伝疾患の治療の試みに造血幹細胞あるいは造血前駆細胞の脳内移住が利用されている¹⁷²²⁾。しかしながら、これらのモデル動物には放射線照射が行われ、脳実質には傷害が加えられており、「MPS の実験的根拠と問題点、ならびに批判」の項(p. 87)で述べた如く、無刺激定常状態でのミクログリアの分化、成熟を反映したものではない。

無刺激定常状態での脳内への造血幹細胞ないし造血前駆細胞の移住に関しては、上述した如く、*op/op* マウスの骨髄内では単球系細胞の分化障害、末梢血中の単球の欠如、組織内での単球のマクロファージへの分化障害のあるも拘わらず、大脑海馬回ではミクログリアは正常に発達し、ミクログリアは単球系細胞以前の分化段階のミクログリア前駆細胞に由来し、このミクログリア前駆細胞は末梢血からの造血幹細胞ないし造血前駆細胞の脳内移住によるものである。すでに「SDF-1/CXCR4 欠損マウスならびに SDF-1 遺伝子導入マウス」の項(p. 309)で述べた如く、造血幹細胞や造血前駆細胞は SDF-1/CXCR4 を介しての組織内に移住し、造血幹細胞や造血前駆細胞の遊走を惹起する SDF-1 や PU.1 のメッセージは脳でも他の組織同様に産生され(図 78 参照)、常時産生される M-CSF や GM-CSF とともに組織マクロファージと同一範疇に属する静止型ミクログリアの遊走に関与する。PU.1 は胎生期のみならず成熟脳でもミクログリアから産生され、M-CSFR(*c-fms*: CD115)を始め種々の CSF 受容体の発現を調節する¹⁷²³⁾。

Op/op マウスの大脳実質内での海馬回以外の部位ではミクログリアは減少を示すが、M-CSF の連日投与ではミクログリアは増加せず、GM-CSF や IL-3 の投与によって円形ないし類円形のミクログリアが増加し、胎生期の脳に出現するアメーバ状ミクログリアに類似する⁵²⁰⁾。すでに「中枢神経系の個体発生におけるミクログリアとマクロファージの発生と分化」の項(p. 232)で述べた如く、末吉 (1985)は筆者との共同研究で、胎生 10~12 日頃卵黄囊造血から原始/胎生マクロファージが造血幹細胞とともに末梢血を介して脳原基に移住し、アメーバ状ミクログリアに分化、成熟を報告し、この過程は脳原基における血管の発達と平行し、卵黄囊と胎仔心血管系の連結以降に起こることを明らかにした¹²¹⁷⁾。この研究成績に準拠して、筆者はアメーバ状ミクログリアの卵黄囊起源と原始/胎生マクロファージからの派生と分化を繰り返し主張した^{1, 341, 475~477)}が、この考えはその後多くの研究者によって容認されるに至った^{1223, 1701, 1724~1731)}。卵黄囊静脈と胎仔心血管系が連結すると、胎生期

に初発する卵黄囊造血内で発生し、造血幹細胞から分化した原始/胎生マクロファージは脳原基の軟脳膜に移住し、血管を介して脳実質内に侵入し、アメーバ状ミクログリアに分化し、脳実質の各所に分布する^{1, 475~477, 1223, 1701, 1724~1731}。周産期から新生時期にかけてアメーバ状ミクログリアは減少するが、やがて細長い細胞突起を伸ばした静止型ミクログリアと分化、成熟する^{1223, 1669, 1727~1731}。このように、静止型ミクログリアの前駆細胞は個体発生上胎生早期に卵黄囊造血に起源し、末梢血中を介して循環する造血前駆細胞に由来し、脳原基に移住し、無刺激定常状態での成熟個体の脳実質内に移住する。この静止型ミクログリアの前駆細胞は van Furth ら(1970, 1972)の MPS 学説で主張された単球とは見做し難い。むしろ、胎生期に出現するアメーバ状ミクログリアの前駆細胞と同様に、単球系細胞以前の分化段階にある造血幹細胞あるいは造血前駆細胞から分化した未熟な細胞であって、アメーバ状ミクログリアは増殖能を有し、生後静止型ミクログリアに分化し、増殖能が保持され、脳実質内で自己再生によって長期間生存する^{1223, 1726}。

Mac-1 は CD11b(CD18)で、F4/80 とともにマクロファージを標識し、主に単球、顆粒球、NK 細胞を認識し、骨髄系造血前駆細胞(myeloid hematopoietic progenitors)のマーカーと見做されるが、D11b(CD18)遺伝子欠損マウスでの検討では、胎生期の脳原基におけるアメーバ状ミクログリアのコロニー形成には障害はなく、*iba-1* やレクチン陽性のミクログリア前駆細胞が胎生 11~14 日の脳原基内分布が検出され、この事実からミクログリア前駆細胞は CD11b の発現以前の分化段階の未熟な骨髄系前駆細胞が考慮される¹⁷³²。Vitry ら(2003)は決定造血の発生母地である AMG の原始造血幹細胞に増幅 GFP 遺伝子を組み込んだ AGM-HSC 細胞を作製し、AMG-HSC 細胞を放射線キメラマウスの胎仔脳に移植した。移植後 17~21 日にはドナー由来の GFP 発現 AMG 細胞が脳実質内には検出され、1 週間後には多くの移植細胞が F4/80 マクロファージ抗原を発現し、分枝状ミクログリアへと分化した¹⁷²⁸。これに対して、Alliot ら(1999)は胎生 7.5~8.5 日にマウス胎仔尾部の胚内に初発し、胎生 9 日の傍大動脈内臓葉から発生する決定造血には、ミクログリア前駆細胞(microglial progenitors)が検出されず、ミクログリアの前駆細胞は卵黄囊に起源することを主張した¹²²³。さらに、Bertrand ら(2006)は卵黄囊マクロファージを新生児マウスの脳に直接注入し、あるいは静注すると、卵黄囊マクロファージは脳内に移植され、6 ヶ月間以上も生存し、静止型ミクログリアに分化、増殖することを実証した¹¹⁷⁹。以上の知見からミクログリア前駆細胞は決定造血のみならず卵黄囊造血に起源し、脳内に移住し、ミクログリアに分化し、生後も長期間脳内で生存することが明らかにされている。

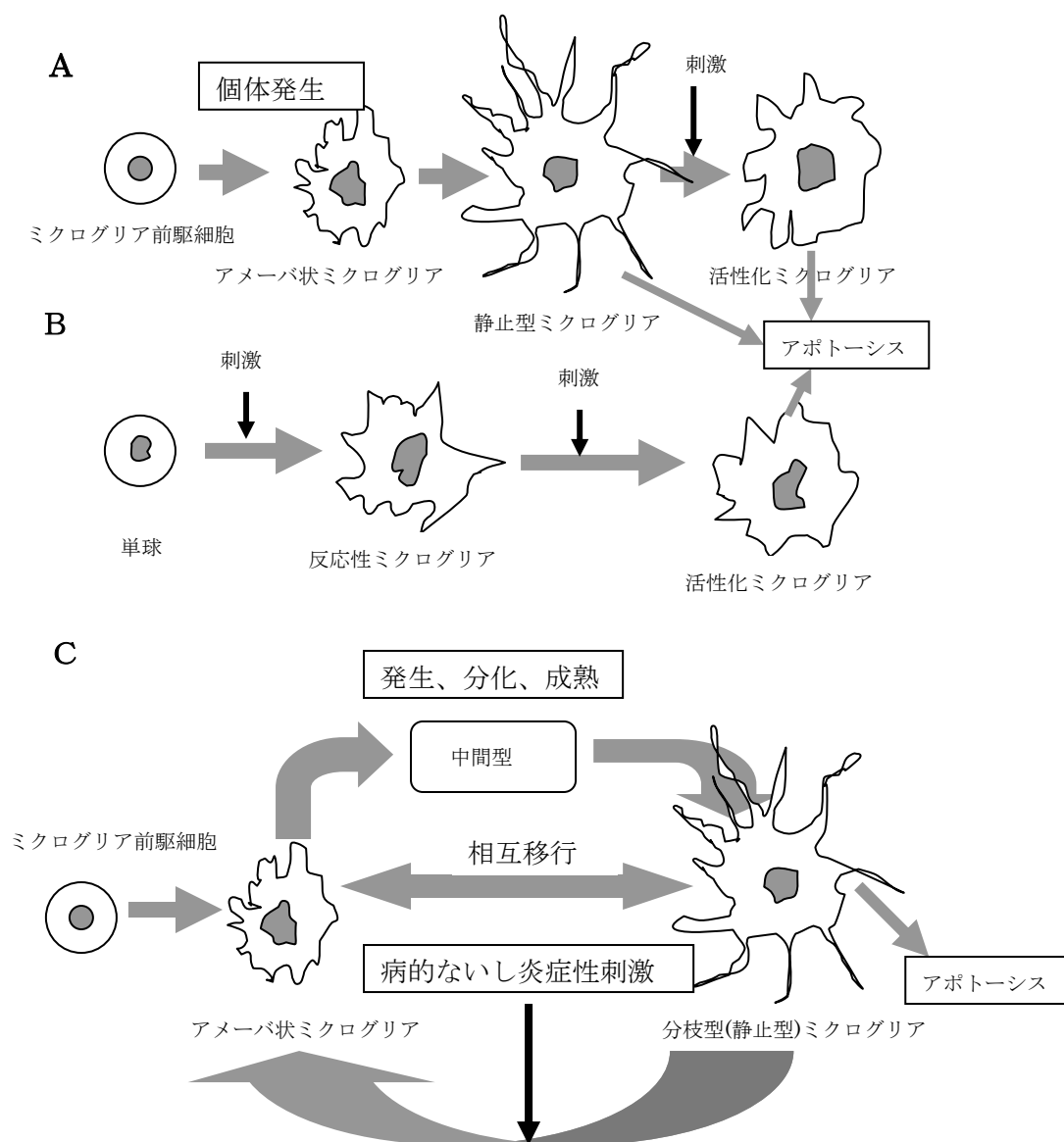
卵黄囊造血に起源する静止型ミクログリアの個体発生過程は Inamdar ら(1997)による ES 細胞の初期培養で明らかにされ、培養初期には卵黄囊造血に相当する造血巣の発生が実証された¹⁷²⁵。すなわち、ES 細胞の培養実験で、培養 9.5 日には卵黄囊マクロファージに相当する細胞が発生し、このマクロファージから卵黄囊マクロファージ細胞株 Py-YSA が単離、樹立され、GM-CSF を加えると、この卵黄囊マクロファージ株細胞からミクログリア様細胞の発生が誘導された¹⁷²¹。このミクログリア様細胞の 90%は Mac-1 を表出し、さ

らに I 型、II 型 MHC、CD40、CD80、INF- γ R を発現した¹⁷²⁵⁾。GFP 導入マウスから ES 細胞を作製し、培養すると、GFP 陽性ミクログリアならびにマクロファージの発生が誘導され、これらの培養細胞を成熟 C57BL/6 マウスに静注すると、脳梁や海馬角、まれに大脳皮質にアメーバ状あるいは分枝状の GFP 陽性ミクログリアが検出され、その多くにミクログリアのマーカー *iba-1* が表出された¹⁷²⁵⁾。しかし、ES 細胞由来の GFP 陽性マクロファージは腹腔、脾臓、リンパ節などの末梢組織には分布するが、脳内への移住は極めて少なく、逆に GFP 陽性ミクログリアは殆ど脳以外の末梢組織には移住しない¹⁷²⁵⁾。以上述べた ES 細胞を用いての研究成績を加えると、ES 細胞の培養でも卵黄囊造血における造血幹細胞由来のミクログリア前駆細胞が発生し、この事実から卵黄囊からの原始/胎生マクロファージの発生とその脳原基への移住とミクログリアへの分化過程が支持され、この分化過程は単球系細胞の出現以前の現象である。同時に、Inamdar ら(1997)の研究成績から ES 細胞由来のマクロファージの脳実質への移住は起らず、むしろその多くは脳実質以外の末梢性内臓組織に移住する。この過程は ES 細胞が脳原基には移住せず、筆者らが明らかにした卵黄囊由来の原始/胎生マクロファージが脳原基を含む全身各所の胎仔組織に移住し、組織マクロファージやアメーバ状ミクログリアへと分化、成熟する事実と一致する。

そこで問題になるのはミクログリア前駆細胞 (microglial progenitors) の位置付けであろう。上述した事実から考慮すると、卵黄囊での原始造血に初発する造血幹細胞から造血前駆細胞、さらに骨髓系前駆細胞に分化する。骨髓前駆細胞は「脊椎動物の個体発生における造血とマクロファージ発生」の項(p. 208)で述べた如く、卵黄囊造血内の造血幹細胞から高増殖能コロニー形成細胞(HPP-CFC)として発生した決定造血前駆細胞 (definitive hematopoietic progenitors) に相当し、ミクログリア前駆細胞は骨髓系前駆細胞から分化した細胞群と見做され、胎生早期に卵黄囊で分化した骨髓系前駆細胞が末梢血中を循環、移動し、脳原基内に移住した細胞である。しかし、研究者によっては、アメーバ状ミクログリアをミクログリア前駆細胞と見做す見解も提示されている。この点に関しては、胎生期に脳原基内に出現するアメーバ状ミクログリアは著者らが命名した胎生マクロファージとほぼ同一のレベルにある分化段階に相当するものと思われる。

炎症、感染、損傷などによって脳実質に刺激が加わると、既存の静止型ミクログリアは活性化され、原形質は腫大し、機能的にも活性化され、機能亢進を起し、活性化ミクログリアに変態する。このような刺激状態の脳では、静止型ミクログリアの活性化によって MCP-1 を始めとする種々の単球遊走因子が産生され、同時に血管内皮細胞、星状膠細胞などの局所細胞からも単球遊走因子の産生が起り、単球は末梢血中から脳病変内に浸潤し、反応性ミクログリアに分化する。刺激によって反応性ミクログリアは活性化され、単球由来のマクロファージの活性化と同様に活性化ミクログリアに変態する。ミクログリアは van Furth ら(1970, 1972)が提唱した MPS 学説では MPS の一員と見做され、これは炎症性あるいは傷害性脳病変における反応性ミクログリアや活性化ミクログリアの動態に関する研究成績に基づいたもので、刺激によって単球が脳内に浸潤し、局所でミクログリアに分化

図 84 ミクログリアの発生、分化、成熟に関する諸説



し、活性化する径路の存在を物語るものである。

図 84 はミクログリアの諸型と発生、分化、成熟ならびに相互関係を模式図で示したものである。**B** は炎症、感染症、損傷などで脳が刺激され、刺激状態で単球が脳内に浸潤し、局所で反応性ミクログリアに分化し、活性化し、この浸潤と活性化機序には **MCP-1** や **M-CSF** の作用が重要である。これに対して、**A** は個体発生上卵黄嚢に発生する造血幹細胞由来のミクログリア前駆細胞が末梢血を介して胎生脳に移し、局所でアメーバ状ミクログリアに分化し、ミクログリア前駆細胞の脳内移住には主として **SDF-1** や **PU.1** が作用する。アメー

バ状ミクログリアは周産期から生後には静止型ミクログリアへと分化し、増殖能を有し、M-CSF や GM-CSF などの関与が重要である。静止型ミクログリアは刺激によって活性化ミクログリアへと変態する。A で提示された静止型ミクログリアの分化過程は無刺激定常状態の脳で見られた現象であって、B で提示した刺激状態で惹起される単球由来の反応性ミクログリアへの分化過程とは異なる。C は Rezaie & Male (1999, 2002)^{1727, 1729}、Rezaie (2003)¹⁷³⁰、Chan ら(2007)¹⁷³¹によって提唱された概念で、ミクログリアを単球系細胞とは別系列に細胞と見做し、多能性造血幹細胞由来の CFU-GM 細胞系列に属するミクログリア前駆細胞から派生し、他の組織に特異的なマクロファージとは細胞形態、増殖能、イオンチャネル・パターンを異にし、中枢神経系組織と言う特異な環境に住み着き、単球やマクロファージと共有する表現型の特徴や酵素マーカーは低下し、喪失する。ミクログリア前駆細胞はアメーバ状ミクログリアに分化し、さらに中枢神経系に成熟に伴い中間型を経て分枝状に成り、静止型ミクログリアに成熟する。成熟個体の脳内では、分枝状ミクログリアは炎症性あるいは病的刺激に反応し、急速に脱分化し、活性化アメーバ状ミクログリアに転換すると主張した。このように、ミクログリアはミクログリア前駆細胞から分化し、アメーバ状ミクログリアと分枝状ミクログリアとの 2 型に区別され、両者は刺激に応じて相互変換し、成熟した分枝状ミクログリアはアポトーシスを起し、死滅する。

以上述べた如く、静止型ミクログリアは胎生初期の卵黄囊造血に起源し、原始/胎生マクロファージの一種であるアメーバ状ミクログリアに由来し、生後は緩やかな細胞回転を示し、長命で、低レベルながら増殖能を有し、終生維持される細胞群であると理解される。この分化過程は、病的状態の脳で、刺激によって末梢血中から動員され、脳内に浸潤した単球がミクログリアへと分化すると主張された van Furth ら(1970, 1972)の MPS 学説^{4,5}とは異なった別の代替分化経路(alternative differentiation of macrophages)を辿ることを物語るもので、無刺激定常状態での全身各所の組織マクロファージの分化過程と軌を一にする。

7) まとめ: マクロファージの発生と分化に関する実験的解析

以上「マクロファージの発生と分化に関する実験的解析」の各項目で纏めた小括を総括すると、ヒト、マウス、ラットなどの哺乳類では、生後生体各所に存在するマクロファージは骨髄での造血幹細胞に起源するマクロファージ前駆細胞に由来し、骨髄から末梢血中に放出された前駆細胞は血中を循環し、局所組織に移住、侵入し、マクロファージに分化、成熟する。この過程で、種々の遺伝子が発現し、骨髄前駆細胞の分化段階、骨髄から末梢血中に放出された前駆細胞の運命や組織内への遊走、移住、侵入、ならびに組織に侵入、移住した前駆細胞のマクロファージへの分化、成熟過程は無刺激定常状態と刺激炎症状態とで異なり、遺伝子発現や増殖因子の産生は著しく相違する。

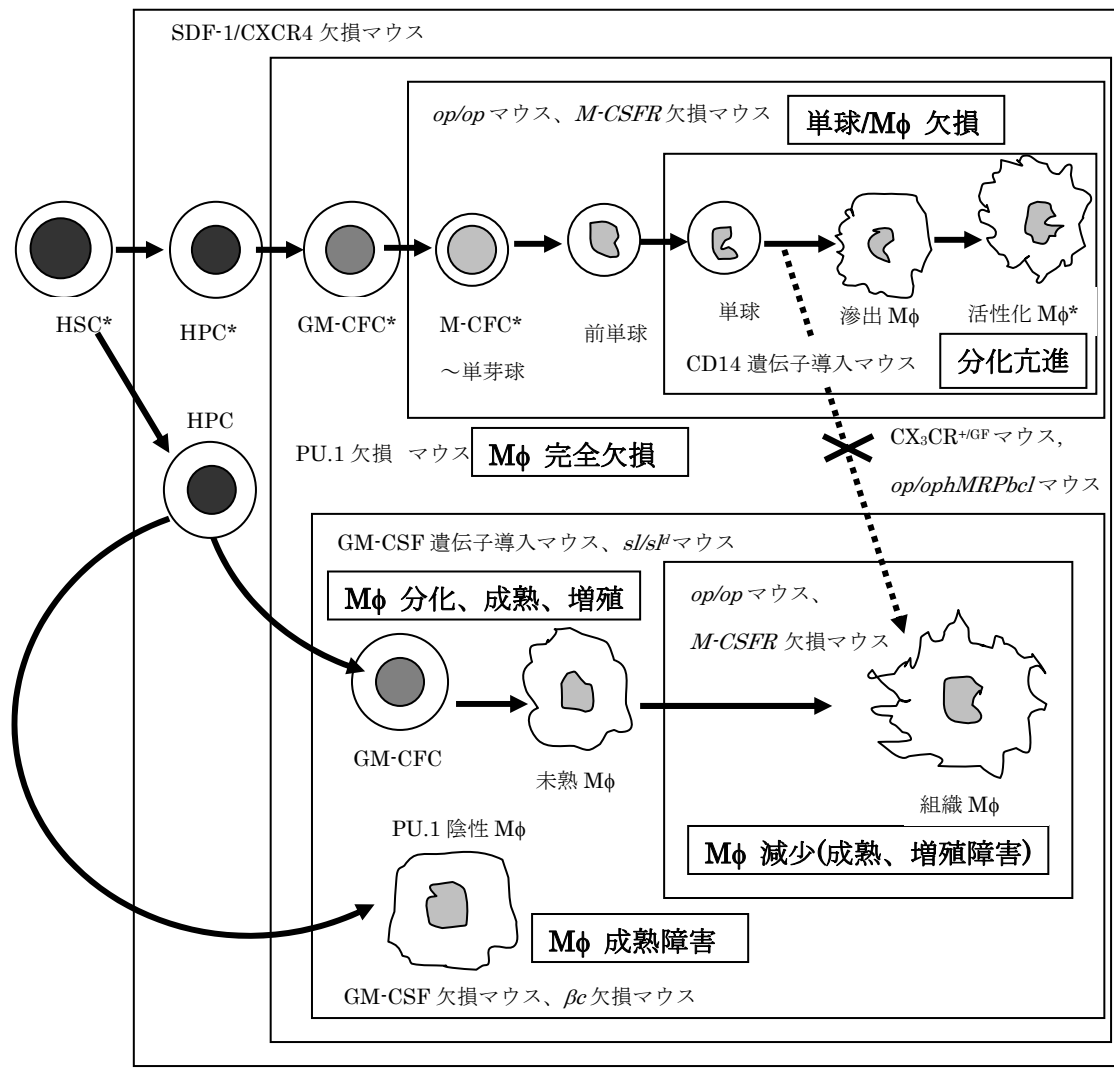
マクロファージの単球由来は van Furth ら(1972, 1975, 1980)の MPS 学説によって主張され^{5, 424, 426}、この学説によれば、刺激によって炎症巣内に浸潤する滲出マクロファージ

のみならず無刺激定常状態の生体各所に住み着いている組織マクロファージを含めてすべてのマクロファージは骨髓から動員された単球が組織に移住し、分化、成熟したマクロファージと主張された。Hume ら(2002、2006)は MPS 学説に包括される細胞が樹状細胞を含めて M-CSFR (CSF-1R: CD115)を発現する細胞群と規定し、マクロファージの個体発生、組織マクロファージの増殖、他の細胞種への変換分化や細胞融合などの問題などで今日まで挑戦を受けているが、van Furth らの提唱した MPS 学説はまだ生き永らえていると主張し、MPS 学説を支持している^{565, 566)}。しかしながら、「MPS の実験的根拠、問題点ならびに批判」の項(p. 87)で述べた如く、この学説の誤謬は炎症や損傷を始め種々の刺激状態において得られたマクロファージの研究成果をそのまま無刺激定常状態における組織マクロファージの分化、成熟過程にも当て嵌めたことに起因するものであって、刺激状態と無刺激生理的状态とを区別せずに同一の視点から論じた点にある。「マクロファージの発生と分化に関する実験的解析」で詳述した如く、Volkman ら(1982、1983)や筆者らの行った⁸⁹Sr 投与極度単球減少症惹起マウス^{463~465, 467, 468)}、Shibata & Volkman (1985)の先天性貧血(*sl/sl^d*)マウス¹³⁶⁴⁾、ならびに⁸⁹Sr 投与 *sl/sl^d*マウス¹³⁶⁶⁾での末梢血単球の持続性欠如状態でも生体各所の組織マクロファージの発達には異常がなく、これらの事実は炎症巣内の滲出マクロファージが無刺激定常状態の組織マクロファージと同様にすべて末梢血単球には由来すると言う MPS 学説の主張とは明らかに矛盾する。

Daems ら(1972)²⁵⁵⁾や小島ら(1976)²⁵⁶⁾がすでに指摘した如く、組織マクロファージと単球由来のマクロファージとでは PO 活性の超微形態学的な局在の差異から明確に識別され、それぞれ前駆細胞や分化過程を異にし、無刺激定常状態では組織マクロファージは長命で、増殖能を保有し、自己再生によって維持される。これに対して、無刺激定常状態では単球ないし単球由来のマクロファージは短命で、増殖能を欠き、長くとも 2~5 週間程度で死滅する。組織マクロファージは単球系細胞以前の分化段階にある造血前駆細胞あるいは造血幹細胞から補給され、骨髓内の多能性造血幹細胞は CD34、c-kit、CD133 を発現し、やがて CXCR4 の発現を惹起し、CD34/CD133/CXCR4 陽性造血前駆細胞は SDF-1 に作用で末梢血へと動員される。この未熟造血前駆細胞は末梢血から末梢組織内へと移住し、組織コミット幹細胞になり、組織マクロファージへと分化、成熟し、この分化過程には局所組織で産生される SDF-1、PU.1、GM-CSF、IL-3、M-CSF などが関与する。組織マクロファージには一定の寿命があり、アポトーシスに堕ち、死滅するが、骨髓から末梢血、さらに組織内へと補給された造血幹細胞ないし造血前駆細胞が局所で組織マクロファージに再生する。

この過程は Tavassoli & Yoffy (1983)³⁹⁸⁾を始め多くの研究者によって主張され、Daems & de Bakker (1982)によっても腹腔在住マクロファージが増殖能を保有し、骨髓の造血幹細胞に起源する造血前駆細胞に由来し、末梢血を介して乳斑に移住し、マクロファージ前駆細胞 (pro-resident macrophages)を経由して腹腔マクロファージに分化、増殖すると主張された¹⁷³³⁾。Hume ら(2002、2005)は MPS 学説を支持する立場から M-CSFR(CSF-1R:

図 85 遺伝子改変マウスにおけるマクロファージの発生、分化ならびに成熟



*HSC: 造血幹細胞、HPC:造血前駆細胞、GM-CFC: 顆粒球・マクロファージ・コロニー形成細胞、

M-CFC: マクロファージ・コロニー形成細胞、Mφ: マクロファージ

CD 115)の発現を重視し、MPSの帰属細胞をM-CSFRを発現する細胞群と規定した^{565, 566)}。しかしながら、すでに述べた如く、M-CSFR欠損マウス^{521, 1271)}のみならず^{op/op}マウス^{1, 475 ~477, 520, 1265)}、抗マウスM-CSF抗体連続投与マウス¹²⁸⁵⁾などで数の減少はあるものの全身各所にM-CSF/M-CSFR非依存性マクロファージが発生し、GM-CSF遺伝子導入マウス¹²⁸¹⁾でもM-CSF非依存性マクロファージが発達する¹²⁸²⁾。組織マクロファージは単球系細胞を経由せずに造血幹細胞ないし造血前駆細胞から分化し、この分化過程に関しては^{Sr⁸⁹}投与極度単球減少症惹起マウス、^{sl/slΔ}マウス、^{op/op}マウス、GM-CSF欠損マウス、GM-CSF遺伝子導入マウス、^{βc}欠損マウスや種々の遺伝子欠損マウスの重複欠損マウス、あるいはSDF-1/CXCR4やCX₃CRなど種々のケモカイン欠損マウスなどの解析から実証されている

(図 85 参照)。

常時末梢血中を循環している単球は炎症性刺激で活性化され、CD14 を発現し、局所組織内で刺激によって産生される MCP-1 を主とする CC ケモカインやフラクタルカインなどの単球遊走因子の作用で、炎症局所に浸潤、移住し、種々の造血因子の作用で滲出マクロファージに分化、成熟する。とりわけ、M-CSF の作用が骨髄組織内での単球系細胞の発達と単球の局所組織内での滲出マクロファージへの分化、成熟には重要である。*Op/op* マウスの解析では、M-CSF の欠如によって骨髄内での単球系細胞の発達障害、末梢血単球の欠如、組織での単球のマクロファージへの分化障害、単球由来の滲出マクロファージの発生障害が起る。*op/op* マウスへの M-CSF の投与あるいは M-CSF 遺伝子導入によって単球系細胞やマクロファージは正常に回復し、筆者らは M-CSF で回復するマクロファージを M-CSF 依存性マクロファージと呼んだ(表 16 参照)^{475~477})。しかし、*op/op* マウスの全身各所の組織内には、正常マウスに比べて、組織によって種々の程度に数の減少があるが、未熟な M-CSF 非依存性マクロファージが発達し、このマクロファージは単球系細胞以前の分化段階の造血前駆細胞から GM-CSF や IL-3 などの造血因子の作用で分化した細胞と見做される。この分化過程の亢進は *op/op* マウスの老化に伴って発現し、局所組織での GM-CSF や IL-3 の産生亢進によって起り、骨大理石病は改善され、破骨細胞の増加に留まらず肺泡マクロファージや骨髄マクロファージなどの組織マクロファージも増加し、M-CSF 非依存性マクロファージの増加は筆者らの行った若年 *op/op* マウスへの GM-CSF、IL-3 単独あるいは両者併用投与でも立証されている⁵²⁰)。

GM-CSF 遺伝子導入マウスは成長期に腹腔ならびに胸腔マクロファージの増加を起し、これは体腔局所で過剰産生された GM-CSF の作用によって体腔マクロファージの自己増殖によって維持され、体腔マクロファージの発達は単球とは無関係である^{1287~1292})。この GM-CSF 遺伝子導入マウスに GM-CSF/IL-3/IL-5 β c 鎖欠損(β c^{-/-})マウスを交配させて作製した GM-CSF 遺伝子導入 β c^{-/-}マウスでは、体腔マクロファージの数は正常化する¹²⁹²)。このように、GM-CSF の過剰産生によって GM-CSF 依存性マクロファージは単球とは無関係に発達する。GM-CSF 欠損マウスでは、肺泡蛋白症が発症し^{1293, 1294})、これは肺泡マクロファージのサーファクタント代謝障害に起因する。GM-CSF 欠損マウスの肺泡マクロファージは未熟で、PU.1 は陰性、刺激に対する反応が遅れ、生存期間が短く、アポトーシスが亢進し、細胞回転が速い^{1296, 1314})。GM-CSF 欠損マウスでは、肺泡マクロファージ以外の組織でもマクロファージは PU.1 陰性で、グルカン投与肝肉芽腫形成実験でも肉芽腫マクロファージの性状は基本的に肺泡マクロファージやその他の部位の組織マクロファージとも同一である⁴⁸⁸)。GM-CSF 欠損マウスに GM-CSF を投与すると、肺泡蛋白症は改善し、未熟な PU.1 陰性肺泡マクロファージは PU.1 を発現し、サーファクタント代謝機能は正常化する^{1296, 1314})。マウスやラットでは同様の PU.1 陰性未熟マクロファージは生後肺胞内に発生し、生後 10 日頃までに PU.1 を発現し、肺泡マクロファージへと成熟する。

PU.1 は造血前駆細胞が骨髄系細胞ならびに B 細胞への分化を規定する転写因子で、造血

細胞の分化の早い時期に発現し、PU.1 陰性細胞は単球系細胞以前の分化段階と見做され、PU.1 陰性マクロファージは単球系細胞以前の分化段階のマクロファージ前駆細胞に由来する。PU.1 陰性未熟肺泡マクロファージは GM-CSF 欠損マウスのみならず $\beta c^{-/-}$ マウスにも発生し^{1300~1302}、それ以外の組織のマクロファージも PU.1 陰性である。しかし、GM-CSF 欠損マウスや $\beta c^{-/-}$ マウスでは、全身各所の組織におけるマクロファージの数は野生型マウスと同じである。筆者らが行った GM-CSF 欠損マウスのグルカン投与による肝肉芽腫形成実験では、Kupffer 細胞の動員や集族には遅れが見られ、早期に死滅し、Kupffer 細胞の生存は短く、肺泡マクロファージと同様に異常を示す。Op/op-GM-CSF 重複欠損マウスでは、M-CSF と GM-CSF とのそれぞれの欠損による病態が重複して発現し、op/op マウスと同様の組織マクロファージの減少が発現する¹²⁷⁸が、op/op-GM-CSF 重複欠損マウスでも未熟なマクロファージが発達し、この種のマクロファージもまた単球系細胞以前の分化段階のマクロファージ前駆細胞から直接発生、分化した細胞群と考えられる。

PU.1 欠損マウスは、その多くが胎生期に死亡し、骨髄系細胞ならびに B 細胞の分化を決定する転写因子の欠損によって単球系細胞あるいは単球以前の分化段階の骨髄系細胞から分化系列上終末細胞として分化、成熟するマクロファージや破骨細胞、ミクログリアなどのマクロファージ類縁細胞、あるいは樹状細胞はすべて欠如する^{522, 523}。しかし、PU.1 欠損マウスの胎仔は生きて産まれることがあり、この新生仔に出生直後から抗生物質の投与を開始すると、2 週間程度生存し、その間に骨髄や肝臓などに大型の PU.1 陰性食細胞が出現する⁵²³。PU.1 欠損 ES 細胞の培養でも PU.1 陰性マクロファージが発生し、卵黄嚢造血での原始/胎生マクロファージの発生の初期でも PU.1 陰性で、この時期には単球系細胞の発達はない。しかし、PU.1 は肺泡マクロファージの最終分化でも発現し、GM-CSF 欠損マウスの肺泡マクロファージは PU.1 陰性で、未熟であるが、GM-CSF の噴霧や投与あるいは GM-CSF 遺伝子導入で PU.1 が発現し、肺泡マクロファージに成熟する。マウスやラットでも生下時肺泡マクロファージは PU.1 を発現しないが、やがて PU.1 が発現し、成熟した肺泡マクロファージへと分化するが、この分化過程には単球の関与は見られない。

無刺激定常状態では、末梢血中を循環している単球は活性化されず、CD14 の発現は低下、消失し、アポトーシスに堕ちて死滅し、血流に面して分布しているマクロファージによって貪食、分解、処理される。これは上述した如く、種々の方法による単球増多症惹起実験でも、組織局所が刺激されないと、単球の組織内侵入や移住は起らず、各所組織内でのマクロファージの系統的な増加は起らない事実からも裏付けられる。しかし、組織局所に刺激が起ると、TNF- α や IFN- γ などの炎症性サイトカインや MCP-1 を始めとする種々の単球遊走因子が産生され、単球は炎症性サイトカインによって活性化され、MCP-1 などの単球遊走因子の作用で CCR2 を介して組織内に侵入し、この侵入過程の障害は MCP-1 欠損マウスや CCR2 欠損マウスで実証されている。しかし、MCP-1 遺伝子導入マウスでは、MCP-1 の過剰産生の結果、末梢血中には持続的単球増多が惹起されるが、胸腺や中枢神経系などある特定の組織や MCP-1 の過剰産生の結果誘発される脂肪組織などでの炎症性病変以外で

は、単球/マクロファージの浸潤は起らず、これらの組織や病変でも浸潤は、主に血管周囲に限局し、すべての臓器、組織に移住して、単球が組織マクロファージに分化し、増加する現象は見られない。

単球から滲出マクロファージに分化し、さらに組織マクロファージに分化するという van Furth らの主張に関しては、「MPS の実験的根拠と問題点、ならびに批判」の項(p. 87)で詳述した如く、種々の異論が提示されたが、*op/ophMRPbcl* マウス、*CX₃CR⁺/GFP* マノックイン・マウス¹⁵³⁰⁾の検討からも単球から組織マクロファージへの分化過程は実証されない。さらに、単球を含む白血球に発現する CD14 に関しては、ヒト CD14 遺伝子導入マウスは内毒素性ショックを惹起し、約半数の動物は死亡するのに対して、CD14 欠損マウス、TLR-4 欠損マウス、C3H/HeJ マウス、MyD88 欠損マウス、macLITAF 欠損マウスは感染や LPS によって惹起されるショックに対して極度の抵抗を示し、炎症性サイトカインの産生は低下ないし欠如する。これら事実から CD14、TLR-4、TNF- α 、MyD88、LITAF などの蛋白質は主として LPS の刺激によって惹起された単球ならびに単球に由来するマクロファージ発現し、炎症性サイトカインを産生するが、無刺激定常状態における諸臓器、組織に常在する組織マクロファージにはこれらの蛋白は発現しない。

マクロファージに発現する種々のスカベンジャー受容体に関しては、無刺激定常状態では SR-A-I、II は広く臓器、組織に分布する組織マクロファージに発現し、MARCO の発現も無刺激状態では白脾髄周辺の辺縁帯マクロファージ、リンパ節の辺縁洞や髄質のマクロファージ、腹腔マクロファージに見られるが、単球には発現しない。しかし、刺激状態では、単球由来のマクロファージにも SR-A-I、II、MARCO が発現する。スカベンジャー受容体の一つと見做される Hb/Hp 複合体受容体、CD163 は肝臓のマクロファージ(Kupffer 細胞)、赤脾髄マクロファージ、骨髄マクロファージなど生体内に広く分布する組織マクロファージに発現する。この受容体は専ら組織マクロファージに発現し、ラットでも ED2(CD163)は組織マクロファージにのみ表出され、単球には発現しない。しかし、ヒトでは 10~30%の単球に CD163 が発現し、ヘモクロマトーシスやヘモシデローシスのどの鉄蓄積症では全身的に増加するマクロファージに CD163 の発現が増強する。このように、SR-A-I、II、CD163 などのスカベンジャー受容体は無刺激定常状態では専ら組織マクロファージに発現し、単球や単球由来のマクロファージには発現せず、あるいは発現の低下を示すが、刺激状態では単球ないし単球由来のマクロファージにも発現し、あるいは発現の増強を起す。これに対して、CD14 の如く、無刺激定常状態でも単球に発現し、刺激によって発現が増強し、マクロファージにも発現する。以上述べた如く、無刺激定常状態での受容体の発現は単球ないし単球由来のマクロファージと組織マクロファージとでは異なるが、刺激によって両マクロファージ群にオーバーラップして発現し、両細胞群は刺激によって活性化され、相互に協調作用を営み、これらの受容体の発現には可塑性が見られる。

急性炎症が好中球を主とする顆粒球浸潤が顕著であるのに対して、慢性炎症、ことに肉芽腫性疾患ではマクロファージが主役を演ずることから、肝肉芽腫の形成と治癒過程にお

けるマクロファージの関与を種々の遺伝子欠損マウスを主とする実験的モデルマウスで解析した。肝肉芽腫の初期には既存の **Kupffer** 細胞が反応し、増殖するとともに、末梢血からの単球を呼び寄せ、単球の滲出マクロファージへの分化や浸潤を促し、集簇し、肝肉芽腫を形成する。MDPCl₂ 封入リポゾーム投与マウスや CD11b-DT 遺伝子導入マウスの **Kupffer** 細胞除去実験で、肝肉芽腫形成ないし肝線維化の過程で、**Kupffer** 細胞と単球由来の滲出マクロファージとは活性化され、その活性化はそれぞれ異なった機序によるものである。**Kupffer** 細胞の活性化によって炎症は抑制され、単球由来の炎症性マクロファージの活性化は炎症を亢進させ、前者は代替的活性化、後者は古典的活性化と呼ばれる。SR-A-I、II 欠損マウスでは、既存の **Kupffer** 細胞に SR-A-I、II が欠損し、グルカンや *C. parvum* 死菌の投与で肝肉芽腫の形成は抑制され、MCP-1 や TNF- α 、IL-1 などの炎症性サイトカインの産生も低下し、マクロファージによる異物の取り込みは低下する。⁸⁹Sr 投与極度単球減少症惹起マウスや *op/op* マウスでは、末梢血中の単球は持続性に減少あるいは欠如状態にあるが、グルカン刺激によって肝肉芽腫が発生し、肉芽腫マクロファージは ⁸⁹Sr 投与極度単球減少症惹起マウスでは既存の **Kupffer** 細胞の増殖によって形成され、*op/op* マウスでは未熟な **Kupffer** 細胞に由来する。筆者は組織マクロファージと単球由来の滲出マクロファージとでは個体発生、分化の面から生後の骨髓造血においてもそれぞれ発生時期、前駆細胞、分化成熟過程を異にすることを繰り返し、述べたが、両細胞群は機能的にもそれぞれことなつた機序によって活性化される。その他、マクロファージの類縁細胞として破骨細胞とミクログリアとの分化、成熟に関しては、van Furth らの MPS 学説によって主張された単球から分化するのではなく、無刺激定常状態では単球系細胞以前の分化段階にある造血前駆細胞から派生することが個体発生や遺伝子改変マウスの検討を含めた研究成績から裏付けられる。

以上述べた「マクロファージの発生と分化に関する実験的解析」の項の総括からも明らかな如く、マクロファージは胎生造血での卵黄囊造血のみならず成熟個体では骨髓の造血幹細胞に起源し、マクロファージへの分化と成熟に関しては、無刺激定常状態では造血幹細胞ないしそれに近い造血前駆細胞が骨髓から末梢血中に常時少量ながら放出され、組織内に移住し、局所で組織マクロファージへと分化する。この分化過程は胎生初期の卵黄囊造血でも見られ、原始/胎生マクロファージは造血幹細胞から分化し、末梢性胎仔組織に移住する。これに対して、決定造血では単球系細胞が発生し、生後も単球は終生骨髓で産生され、末梢血中に放出され、組織に刺激が発現すると、組織局所に移住し、滲出マクロファージに分化、成熟する。この分化過程は van Furth らの MPS 学説で提示されたもので、炎症性刺激によって亢進し、骨髓からは前単球などの未熟な単球系細胞も動員される。しかしながら、組織に刺激が起らないと、単球の大部分は末梢血中を循環している間にアポトーシスに陥ち入り、死滅し、脾臓、肝臓、リンパ組織などマクロファージによって処理される。フラクタルカイン、M-CSF、GM-CSF などの因子は常時局所組織で構成的に産生され、末梢血から単球の組織への動員を促しているが、⁸⁹Sr 投与極度単球減少症惹起マウ

ス、*sl/sl^d* マウス、*op/op* マウスなどでは末梢血中に単球が持続的に欠損している状態でも全身各所組織では、*op/op* マウスの如く、未熟なマクロファージのこともあるが、組織マクロファージは発達し、これらの諸事実は単球を経由することなく、単球系細胞以前の分化段階の造血前駆細胞から組織マクロファージへと分化する経路の存在を実証する根拠と見做され、組織マクロファージは造血幹細胞ないし造血前駆細胞が骨髄から末梢血へと動員され、組織内へと移住し、局所での分化、成熟し、単球ないし単球系マクロファージとは分化過程を異にする。

10 リンパ球系前駆細胞からマクロファージへの分化転換

1) マクロファージのリンパ球起源と B リンパ球の亜型

リンパ球の発生と分化は個体発生を含めて T、B 細胞と中心に多様性が存在する¹⁷²⁴⁾。すでに「マクロファージのリンパ球起源」の項(p. 76)において概説した如く、マクロファージのリンパ球起源は 20 世紀初頭から Maximow (1902, 1906, 1927)^{93, 94, 99, 114)}、Bloom (1932)¹¹⁶⁾、Maximow & Bloom (1957)¹⁵⁵⁾らによって主張され、その後も多くの研究者によって支持された^{393~395)}。B 細胞性白血病や悪性リンパ腫の症例でも経過中リンパ芽球様腫瘍細胞が骨髄系細胞に分化転換し、さらにマクロファージへと分化し、悪性組織球症を発症することが報告され、B リンパ球からマクロファージへの分化転換の起ることが知られている^{388~391)}。マクロファージと B リンパ球との近縁関係は造血幹細胞の骨髄系細胞と B 細胞への分化を規定する転写因子 PU. 1 の解析によっても明らかにされ³⁹²⁾、PU.1 の発現は CD34 陽性造血幹細胞、マクロファージ、B 細胞、好中球、マスト細胞、早期赤芽球などの造血細胞に見られる。すでに述べたように、PU.1 欠損マウスの解析からも骨髄系細胞と B 細胞とが欠損し、造血前駆細胞から骨髄系細胞と B 細胞への二方向性の分化は両細胞系の起源的近縁性を示すものである。

B リンパ球は CD5(Ly-1)の発現によって B-1 細胞(CD5B 細胞)と B-2 細胞(普通の B 細胞)とに大別され¹⁷³⁴⁾、B-1 細胞には CD5 が持続性に発現する B-1a 細胞と CD5 が消失する B-1b 細胞とが存在する^{1734, 1735)}。すでに「マクロファージの個体発生」の項(p. 207)で述べた如く、卵黄嚢に発生する造血細胞の中には決定造血前駆細胞が存在し、これが AMG 領域に起源する決定造血に関連し、肝造血で B-2 前駆細胞が発生し、生後は骨髄に移住し、リンパ節原基を含む末梢性リンパ組織で B-2 細胞に分化する。これに対して、B-1 前駆細胞は個体発生学的に大網と肝原基に局在し、大網乳斑に移住し、生後 B-1 細胞に分化し、腹腔内で自己増殖を営み、年齢とともに B-1 細胞の数が増加する¹⁷³⁶⁾。B-1 細胞は自然抗体や自己抗体を産生し、腹腔 B-1 細胞は脾 B-2 細胞とは分化型列を異にする¹⁷³⁶⁾。脾臓にも B-1 細胞が少数存在し、この細胞群は遺伝子の発現の面からは腹腔 B-1 細胞よりもむしろ脾 B-2 細胞に類似し、ホルボールエステル(PMA)に対する反応を欠如する^{1734~1737)}。このような細胞特性の差異から B-2 細胞と B-1 細胞とは分化系列を異にする細胞群と見做されている。